

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
CARLOS ALBERTO BRUEL GEMIN

**ESTUDO FITOQUÍMICO E AVALIAÇÃO DE ATIVIDADES
BIOLÓGICAS DO EXTRATO ETANÓLICO DE *Acicarpá* *spathulata*
R.Br. (CALYCERACEAE)**



CURITIBA
2011

CARLOS ALBERTO BRUEL GEMIN

**ESTUDO FITOQUÍMICO E AVALIAÇÃO DE ATIVIDADES
BIOLÓGICAS DO EXTRATO ETANÓLICO DE *Acicarpa spathulata*
R.Br. (CALYCERACEAE)**

Dissertação apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Ciências
Farmacêuticas, Setor de Ciências da
Saúde, Universidade Federal do Paraná,
como parte dos requisitos para a
obtenção do título de Mestre em Ciências
Farmacêuticas.

Orientador: *Prof. Dr. Obdúlio Gomes Miguel*
Co-orientadora: *Profa. Dra. Marilis Gomes
Miguel*

CURITIBA
2011

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal do Paraná.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas.

Ao Prof. Dr. Obdúlio Gomes Miguel pela orientação, ensinamentos e, acima de tudo, pela paciência.

Ao Botânico Gert Hatschbach e ao Biólogo Osmar do Santos Ribas pelas Informações e identificação do exemplar da espécie em estudo.

À Prof^a. Dr^a. Ana Luísa Lordello, do Departamento de Química da UFPR, e ao Prof. Dr. *Vitor* Alberto Kerber pelo auxílio na interpretação dos espectros de RMN ¹H e RMN ¹³C, assim como na revisão do texto.

À Doutoranda Cristiane Bezerra da Silva, pelo auxílio na execução das análises de alelopatia, na interpretação dos resultados, elaboração e revisão do texto.

A Doutoranda Cristina Mayumi Sasaki pelo auxílio na obtenção dos espectros de RMN e em diversos momentos desta pesquisa.

Ao Laboratório de Controle de Qualidade II da UFPR pela cooperação na avaliação da atividade antimicrobiana.

Às colegas de Laboratório Milena Kalegari e Beatriz Cristina K. Hirota, pelas constantes contribuições com este trabalho, pela paciência e amizade.

À Prof^a. Dr^a. Josiane Dias pelas análises de ativação de neutrófilos.

A todas as pessoas que estiveram comigo durante o desenvolvimento deste trabalho, colegas, professores e amigos, por suas contribuições.

A todos os funcionários e professores do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, que de formas diversas contribuíram para este trabalho.

A todos os colegas do mestrado, pelas boas lembranças que ficam.

À minha esposa Aline pelo apoio, amor, amizade e incentivo em todos os momentos da minha vida.

A minha filha Izabel, pela paciência em esperar o papai estudar.

Ao Laboratório Catarinense S.A., que permitiu e apoiou o início deste trabalho.

Aos amigos do Laboratório Catarinense e do O Boticário, pelas ótimas ideias.

A minha família, que sempre me apoiou.

Ao fantástico Universo do qual fazemos parte.

RESUMO

A *Acicarpa spathulata* R.Br. (Robert Brown) é uma Calyceraceae endêmica da faixa de areia litorânea na vegetação de restinga que se estende do litoral sul até o nordeste do país. A família tem ocorrência restrita à América do Sul, pertencente à super ordem Corniflorae, da ordem das Dipsacales, uma ordem iridoídica caracterizada por produzir seco-iridóides, triterpenos, esteróides e flavonas. Os objetivos deste trabalho foram contribuir para o estudo fitoquímico com o isolamento e identificação dos principais compostos, testar as atividades antimicrobianas e alelopática do extrato hidroalcoólico particionado com hexano, diclorometano e acetato de etila, e testar a capacidade de ativação de neutrófilos dos compostos isolados. A extração e o particionamento foram realizados em aparelho de Soxhlet modificado, o isolamento foi realizado através de cromatografia em coluna com Silica Gel 60, e posterior purificação através de CLAE semipreparativa. A análise dos extratos permitiu a identificação do ácido clorogênico e o isolamento de mistura de seco-iridóides: secologanina e segologanol, reportados pela primeira vez na espécie. O estudo antimicrobiano revelou que as frações acetato de etila e diclorometano, ricas em seco-iridóides apresentaram inibição do crescimento de *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* até a concentração de 1:16, e a fração hexano inibiu o crescimento de *Pseudomonas aeruginosa* até a concentração de 1:64. O estudo de alelopatia demonstrou grande potencial inibitório na germinação das sementes e no crescimento dos brotos de *Lactuca sativa*, assim como redução do índice mitótico de células meristemáticas das raízes e alterações na atividade enzimáticas dos brotos, principalmente quando comparados os resultados das frações ricas em seco-iridóides ao controle. A mistura de secologanina e secologanol demonstrou capacidade de ativar neutrófilos em todas as concentrações testadas.

Palavras-chave: *Acicarpa*; Calyceraceae; Seco-iridóides; Atividade Alelopática; CLAE semipreparativa; Restinga.

ABSTRACT

The *Acicarpha spathulata* R.Br. (Robert Brown) is an endemic Calyceraceae of the shore sand band on the vegetation of "restinga". The occurrence is extended from the south coast until the northeast of the country. The family occurrence has been restricted in the South America, the family belongs to Dipsacales order, an iridoidic order characterized by producing seco-iridoids, terpens, steroids and flavons. The objectives of this work was to contribute for the phytochemistry study with the isolation and identification of main compounds, to test the antimicrobial and alelopathic activities of the extract and it's fractions with hexane, dicloromethane and etyl acetate, and to test the capacity of activation of neutrophils of isolated compounds. The extraction and the fraction had been carried through in modified Soxhlet, the isolation was carried through column chromatography with Silica Gel 60, and purification with semi-preparative HPLC's column. The extract's analysis allowed to the identification of the chlorogenic acid and isolation of a mixture of seco-iridoids: secologanin and segologanol, this species is reported for the first time. The antimicrobial study shows the fractions etyl acetate and dicloromethane, wich has higher concentration of seco-iridoids, had(s) presented inhibition of *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* grew on the concentration of 1:16, and the hexane fraction inhibited the growth of *Pseudomonas aeruginosa* on the concentration of 1:64. The alelopathic study it demonstrated great inhibition in the germination of the seeds and in the growth of the sprouts of *Lactuca sativa*, as well as reduction of the mitotic index of cells of from the roots and alterations in the activity enzymatic of the sprouts, mainly when compared with the results of the higher seco-iridoids fractions with the control. The mixture of secologanine and secologanol demonstrated the capacity to activate neutrophils in all tested concentrations.

Key words: *Acicarpha*; Calyceraceae; Seco-iridoids; Alelopathic activity; semi-preparative HPLC; Restinga

LISTAS DE FIGURAS

FIGURA 1 –	MAPA DA DISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA DA FAMÍLIA CALYCERACEAE	6
FIGURA 2 –	FOTOS DA <i>A. SPATHULATA</i> NO LOCAL DE COLETA	8
FIGURA 3 –	ESQUELETO BÁSICO E NUMERAÇÃO DE IRIDÓIDES (3A), SECOIRIDÓIDES (3B) E DERIVADOS (3C).	11
FIGURA 4 –	CICLO BIOSSINTÉTICO DOS METABÓLITOS SECUNDÁRIOS.	15
FIGURA 5 –	SISTEMA ANTIOXIDANTE DE DEFESA COMPOSTO POR COMPONENTES ENZIMÁTICOS E NÃO ENZIMÁTICOS.	20
FIGURA 6 –	PERFIL CROMATOGRÁFICO POR CLAE – DAD DO EXTRATO BRUTO DE <i>A. SPATHULATA</i> .	46
FIGURA 7 –	ESPECTROS DE ABSORÇÃO NO UV DOS PRINCIPAIS COMPOSTOS, SEUS TEMPOS DE RETENÇÃO E VALORES DE COMPRIMENTOS DE ONDA DE ABSORÇÃO MÁXIMA.	46
FIGURA 8 –	PERFIL CROMATOGRÁFICO DA FRAÇÃO DICLOROMETANO POR CLAE-DAD	47
FIGURA 9 –	PERFIL CROMATOGRÁFICO DA FRAÇÃO ACETATO DE ETILA (A), CONFIRMAÇÃO DA PRESENÇA DE ÁCIDO CLOGÊNICO POR ADIÇÃO DO PADRÃO A FRAÇÃO (B)	48
FIGURA 10 –	PERFIL CROMATOGRÁFICO DAS SUB-FRAÇÕES 76 A 80 REUNIDAS	50
FIGURA 11 –	PERFIL CROMATOGRÁFICO DAS SUB-FRAÇÕES 81 A 88 REUNIDAS (A), ESPECTRO DE ABSORÇÃO NO UV DOS QUATRO PRINCIPAIS COMPOSTOS (B)	51
FIGURA 12 –	FÓRMULAS ESTRUTURAIS DA SECOLOGANINA E DO SECOLOGANOL	52
FIGURA 13 –	ESPECTRO DE ^1H RMN 100 MHZ DAS SUB-FRAÇÕES REUNIDAS 76 A 80, PURIFICADAS POR CLAE SEMIPREPARATIVA, DILUÍDAS EM METANOL DEUTERADO COM TETRAMETILSILANO COMO REFERÊNCIA (0,0 PPM)	56
FIGURA 14 –	ESPECTRO DE ^{13}C RMN 100 MHZ DAS SUB-FRAÇÕES REUNIDAS 76 A 80, PURIFICADAS POR CLAE SEMIPREPARATIVA, DILUÍDAS EM METANOL DEUTERADO COM TETRAMETILSILANO COMO REFERÊNCIA (0,0 PPM)	57
FIGURA 15 –	DEPT DAS SUB-FRAÇÕES REUNIDAS 76 A 80, PURIFICADAS POR CLAE SEMIPREPARATIVA, DILUÍDAS EM METANOL DEUTERADO COM TETRAMETILSILANO COMO REFERÊNCIA (0,0 PPM)	58
FIGURA 16 –	ESPECTRO INFRAVERMELHO DA MISTURA DE COMPOSTOS ISOLADOS DA FAE	59
FIGURA 17 –	FOTOMICROSCOPIA DA LÂMINA DE CONTROLE POSITIVO COM 10 $\mu\text{G/ML}$ DE PMA	60

FIGURA 18 –	FOTOMICROSCOPIA DA LÂMINA DE SOLUÇÃO DE NEUTRÓFILOS INCUBADOS COM SOLUÇÃO AMOSTRA 5 μ G/ML MOSTRANDO GRÂNULOS AZUIS DE FORMAZAN, INDICANDO ATIVAÇÃO DOS NEUTRÓFILOS	60
FIGURA 19 –	FOTOMICROSCOPIA DA LÂMINA DE SOLUÇÃO DE NEUTRÓFILOS INCUBADOS COM SOLUÇÃO AMOSTRA 10 μ G/ML MOSTRANDO GRÂNULOS AZUIS DE FORMAZAN, INDICANDO ATIVAÇÃO DOS NEUTRÓFILOS	61
FIGURA 20 –	FOTOMICROSCOPIA DA LÂMINA DE SOLUÇÃO DE NEUTRÓFILOS INCUBADOS COM SOLUÇÃO AMOSTRA 15 μ G/ML MOSTRANDO GRÂNULOS AZUIS DE FORMAZAN, INDICANDO ATIVAÇÃO DOS NEUTRÓFILOS	61
FIGURA 21 –	FOTOMICROSCOPIA DA LÂMINA DE SOLUÇÃO DE NEUTRÓFILOS INCUBADOS COM SOLUÇÃO AMOSTRA 25 μ G/ML MOSTRANDO GRÂNULOS AZUIS DE FORMAZAN, INDICANDO ATIVAÇÃO DOS NEUTRÓFILOS	62
FIGURA 22 –	FOTOMICROSCOPIA DA LÂMINA DO CONTROLE NEGATIVO SEM TRATAMENTO (A), E SOMENTE COM NBT (B), MOSTRANDO QUE NÃO HÁ A FORMAÇÃO DE GRÂNULOS AZUIS	63
FIGURA 23 –	MORFOLOGIA DA REGIÃO APICAL E PILÍFERA DE ALFACE	68
FIGURA 24 –	MORFOLOGIA DO HIPOCÓTILO DE ALFACE SOB AÇÃO DAS DIFERENTES FRAÇÕES DE <i>A. SPATHULATA</i>	70

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 –	GRADIENTE DE ELUIÇÃO DO MÉTODO DE PERFIL CROMATOGRÁFICO DO EXTRATO BRUTO	31
TABELA 2 –	GRADIENTE DE ELUIÇÃO DO MÉTODO DE PERFIL CROMATOGRÁFICO DAS FRAÇÕES DC E FAE	32
TABELA 3 –	GRADIENTE DE ELUIÇÃO DO MÉTODO DE PERFIL CROMATOGRÁFICO DAS SUB-FRAÇÕES OBTIDOS DAS FRAÇÕES DC E AE	32
TABELA 4 –	GRADIENTE DE ELUIÇÃO DO MÉTODO SEMIPREPARATIVO DE CLAE	33
TABELA 5 –	RESULTADOS DO ENSAIO SISTEMÁTICO DE ANÁLISE EM FITOQUÍMICA DE <i>Acicarpa spathulata</i> R.Br.	42
TABELA 6 –	RENDIMENTO DAS FRAÇÕES EXTRAÍDAS POR SOXHLET FRAÇÕES EXTRAÍDAS RENDIMENTO EM GRAMAS E EM PORCENTAGEM EM RELAÇÃO À MASSA DA DROGA SECA	44
TABELA 7 –	VALORES ENCONTRADOS NA ANÁLISE RMN ¹³ C 200 MHZ PARA AS SUBFRAÇÕES ACETATO DE ETILA 76 A 80 E VALORES DA LITERATURA PARA O SECOLOGANOL E A SECOLOGANINA	43
TABELA 8 –	VALORES ENCONTRADOS NA ANÁLISE RMN ¹ H 100 MHZ PARA AS SUBFRAÇÕES ACETATO DE ETILA 76 A 80 E VALORES DA LITERATURA PARA O SECOLOGANOL	45
TABELA 9 –	ÍNDICE DE VELOCIDADE DE GERMINAÇÃO (IVG) E PORCENTAGEM DE GERMINAÇÃO (G%) DE ALFACE SUBMETIDA A DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DAS FRAÇÕES HEXÂNICA (FH), DICLOROMETANO (FCL), ACETATO DE ETILA (FAE) E FRAÇÃO ETANOL-ÁGUA (FEA) de <i>Acicarpa spathulata</i>	55

LISTA DE GRÁFICOS

GRÁFICO 1 –	COMPRIMENTO DA RAIZ DE ALFACE EM FUNÇÃO DAS CONCENTRAÇÕES DAS FRAÇÕES HEXÂNICA (FH), FRAÇÃO ACETATO DE ETILA (FAE), FRAÇÃO DICLOROMETANO (FDCL) E FRAÇÃO ETANOL-ÁGUA (FEA) DE <i>A. SPATHULATA</i> . DADOS EXPRESSOS EM PERCENTUAL EM RELAÇÃO AO CONTROLE.	66
GRÁFICO 2 –	COMPRIMENTO DO HIPOCÓTILO DE ALFACE EM FUNÇÃO DAS CONCENTRAÇÕES DAS FRAÇÕES FH, FAE, DCL E FEA. DADOS EXPRESSOS EM PERCENTUAL EM RELAÇÃO AO CONTROLE.	67
GRÁFICO 3 –	ACUMULO DE MASSA SECA DE ALFACE EM FUNÇÃO DAS CONCENTRAÇÕES DAS FRAÇÕES HEXÂNICA (FH), FRAÇÃO ACETATO DE ETILA (FAE), FRAÇÃO DICLOROMETANO (FDCL) E FRAÇÃO ETANOL-ÁGUA (FEA) DE <i>A. SPATHULATA</i> . DADOS EXPRESSOS EM PERCENTUAL EM RELAÇÃO AO CONTROLE.	67
GRÁFICO 4 –	PERCENTUAL DE CÉLULAS MERISTEMÁTICAS DE RAÍZES DE PLÂNTULAS DE ALFACE EM MITOSE, DESENVOLVIDAS SOB DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DAS FRAÇÕES HEXÂNICA (FH), FRAÇÃO ACETATO DE ETILA (FAE), FRAÇÃO DICLOROMETANO (FDCL) E FRAÇÃO ETANOL-ÁGUA (FEA) . DADOS EXPRESSOS EM PERCENTUAL EM RELAÇÃO AO CONTROLE.	69
GRÁFICO 5 –	PERCENTUAL DE CÉLULAS EM PRÓFASE SOB DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DAS FRAÇÕES HEXÂNICA (FH), FRAÇÃO ACETATO DE ETILA (FAE), FRAÇÃO DICLOROMETANO (FDCL) E FRAÇÃO ETANOL-ÁGUA (FEA) . DADOS EXPRESSOS EM PERCENTUAL EM RELAÇÃO AO CONTROLE.	71
GRÁFICO 6 –	PERCENTUAL DE CÉLULAS EM METÁFASE SOB DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DAS FRAÇÕES HEXÂNICA (FH), FRAÇÃO ACETATO DE ETILA (FAE), FRAÇÃO DICLOROMETANO (FDCL) E FRAÇÃO ETANOL-ÁGUA (FEA) . DADOS EXPRESSOS EM PERCENTUAL EM RELAÇÃO AO CONTROLE.	71
GRÁFICO 7 –	PERCENTUAL DE CÉLULAS EM ANÁFASE SOB DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DAS FRAÇÕES HEXÂNICA (FH), FRAÇÃO ACETATO DE ETILA (FAE), FRAÇÃO DICLOROMETANO (FDCL) E FRAÇÃO ETANOL-ÁGUA (FEA). DADOS EXPRESSOS EM PERCENTUAL EM RELAÇÃO AO CONTROLE.	72

GRÁFICO 8 –	PERCENTUAL DE CÉLULAS EM TELÓFASE SOB DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DAS FRAÇÕES HEXÂNICA (FH), FRAÇÃO ACETATO DE ETILA (FAE), FRAÇÃO DICLOROMETANO (FDCL) E FRAÇÃO ETANOL-ÁGUA (FEA). DADOS EXPRESSOS EM PERCENTUAL EM RELAÇÃO AO CONTROLE.	72
GRÁFICO 9 –	ATIVIDADE DA PEROXIDASE EM FUNÇÃO DAS CONCENTRAÇÕES DAS FRAÇÕES HEXÂNICA (FH), FRAÇÃO ACETATO DE ETILA (FAE), FRAÇÃO DICLOROMETANO (FDCL) E FRAÇÃO ETANOL-ÁGUA (FEA) DE <i>A. SPATHULATA</i> EM <i>LACTUCA SATIVA</i> .	73
GRÁFICO 10 –	ATIVIDADE DA CATALASE EM FUNÇÃO DAS CONCENTRAÇÕES DAS FRAÇÕES HEXÂNICA (FH), FRAÇÃO ACETATO DE ETILA (FAE), FRAÇÃO DICLOROMETANO (FDCL) E FRAÇÃO ETANOL-ÁGUA (FEA) DE <i>A. SPATHULATA</i> EM <i>LACTUCA SATIVA</i> . DADOS EXPRESSOS EM PERCENTUAL EM RELAÇÃO AO CONTROLE.	74
GRÁFICO 11 –	ATIVIDADE DA POLIFENOLOXIDASE EM FUNÇÃO DAS CONCENTRAÇÕES DAS FRAÇÕES FH, FAE, FDCL E FEA DE <i>A. spathulata</i> EM <i>Lactuca sativa</i> .	75
GRÁFICO 12 –	ATIVIDADE DA α -AMILASE EM FUNÇÃO DAS CONCENTRAÇÕES DAS FRAÇÕES FH, FAE, FDCL E FEA DE <i>A. spathulata</i> EM <i>Lactuca sativa</i> .	76
GRÁFICO 13 –	ATIVIDADE RESPIRATÓRIA EM RAÍZES EM FUNÇÃO DAS CONCENTRAÇÕES DAS FRAÇÕES HEXÂNICA (FH), FRAÇÃO ACETATO DE ETILA (FAE), FRAÇÃO DICLOROMETANO (FDCL) E FRAÇÃO ETANOL-ÁGUA (FEA) DE <i>A. spathulata</i> EM <i>Lactuca sativa</i> .	77
GRÁFICO 14 –	TEOR DE CLOROFILA EM FUNÇÃO DAS CONCENTRAÇÕES DAS FRAÇÕES HEXÂNICA (FH), FRAÇÃO ACETATO DE ETILA (FAE), FRAÇÃO DICLOROMETANO (FDCL) E FRAÇÃO ETANOL-ÁGUA (FEA) DE <i>A. spathulata</i> EM <i>Lactuca sativa</i> .	78

LISTA DE SÍMBOLOS, SIGLAS E ABREVIATURAS

R.Br.	ROBERT BROWN
HPLC	HIGH PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY
CLAE	CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA
UV	ULTRAVIOLETA
IV	INFRATERMELHO
RMN	RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR
H	HIDROGÊNIO
C	CARBONO
NO	ÓXIDO NÍTRICO
SO	SUPERÓXIDO
DPPH	RADICAL 2,2-DIFENIL-1-PICRILHIDRAZIL
BHA	HIDROXIANISOL BUTILADO
CO ₂	DIÓXIDO DE CARBONO
NH ₃	AMÔNIA
ERO	ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO
RIP	PROTEÍNAS INATIVADORAS DE RIBOSSOMOS
DNA	ÁCIDO DESOXIRRIBONUCLÉICO
O ₂	OXIGÊNIO
H ₂ O ₂	PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO
OH	RADICAL HIDROXIL
SOD	SUPERÓXIDO DISMUTASE
APX	ASCORBATO PEROXIDASE
GSH	GLUTATIONA REDUTASE
PRX	PEROXIREDONA
CAT	CATALASE
PPO	POLIFENOL OXIDASE
N	NORMAL
° C	GRAUS CELSIUS
g	GRAMAS
min	MINUTOS
FH	FRAÇÃO HEXANO
FDC	FRAÇÃO DICLOROMETANO
FAE	FRAÇÃO ACETATO DE ETILA
FEA	FRAÇÃO ETANOL-ÁGUA
EB	EXTRATO BRUTO
NIR	ESPECTROMETRIA DE INFRATERMELHO PRÓXIMO
DAD	DETECTOR DE ARRANJO DE DIODOS
CMI	CONCENTRAÇÃO MÍNIMA INIBITÓRIA
DMSO	DIMETILSULFÓXIDO
PMA	FORBOL 12-MIRISTATO 13-ACETATO
UAE	UNIDADES DE ATIVIDADE ENZIMÁTICA

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	1
2 OBJETIVOS	4
2.1 OBJETIVO GERAL	4
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	4
3 REVISÃO DA LITERATURA	5
3.1 PRODUTOS NATURAIS	5
3.2 FAMÍLIA CALYCERACEAE	6
3.2.1 Características Morfoanatômicas	7
3.2.2 Sistemática e Quimiossistemática	8
3.2.3 Estudos Químicos e Biológicos na Família Calyceraceae	9
3.3 A ESPÉCIE ACICARPHA	9
3.4 ATIVIDADES BIOLÓGICAS ATRIBUÍDAS AOS IRIDÓIDES	10
3.5 ALELOPATIA: CONCEITO E HISTÓRICO	12
3.5.1 Natureza e Função dos Compostos Alelopáticos	14
3.5.2 Vias de Liberação e Fatores que Afetam a Produção de Aleloquímicos	16
3.5.3 Mecanismos de Ação dos Compostos Alelopáticos	17
3.5.4 Principais Classes de Agentes Alelopáticos	17
3.5.5 Defesa Vegetal	18
3.6 ATIVIDADES ANTIMICROBIANAS	21
3.7 ISOLAMENTO E PURIFICAÇÃO POR CLAE – SEMIPREPARATIVA	21
4 MATERIAL E MÉTODOS	23
4.1 OBTENÇÃO DO MATERIAL BOTÂNICO	23
4.2 ENSAIO SISTEMÁTICO DE ANÁLISE EM FITOQUÍMICA	23
4.2.1 Preparo do Extrato Hidroalcoólico a 20%	24
4.2.2 Preparo do Extrato Aquoso a 20%	24
4.2.3 Pesquisa de Alcalóides	24
4.2.4 Pesquisa de Ácidos Orgânicos	25
4.2.5 Pesquisa de Fenóis	25
4.2.6 Pesquisa de Flavonóides	25
4.2.7 Pesquisa de Cumarinas	25
4.2.8 Pesquisa de Antraquinonas	26
4.2.9 Pesquisa de Esteróides e Triterpenos	26

4.2.10 Pesquisa de Heterosídeos Antociânicos	26
4.2.11 Pesquisa de Heterosídeos saponínicos	27
4.2.12 Pesquisa de heterosídeos cianogêncios	27
4.2.13 Pesquisa de Gomas, Taninos e Mucilagens	27
4.2.14 Pesquisa de Taninos	27
4.2.15 Pesquisa de Aminogrupos	28
4.2.16 Pesquisa de Ácidos Voláteis	28
4.2.17 Pesquisa de Ácidos Fixos	28
4.3 ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS	29
4.3.1 Determinação do Teor de Voláteis por Perda por Dessecação e Determinação de Sólidos totais por Resíduo Seco	29
4.3.2 determinação do Teor de Cinzas	29
4.4 PROCEDIMENTOS GERAIS PARA EXTRAÇÃO DAS PARTES AÉREAS DA <i>A. spathulata</i>	29
4.4.1 Fracionamento do Extrato	29
4.4.2 Cromatografia Líquida em Coluna	30
4.4.3 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)	31
4.4.3.1 Perfil Cromatográfico do Extrato Bruto	31
4.4.3.2 Perfil Cromatográfico das Frações DC e FAE e suas subfrações	32
4.4.4 Isolamento e Purificação por CLAE – Semipreparativa	33
4.5 ELUCIDAÇÃO ESTRUTURAL	33
4.5.1 Espectroscopia de Absorção no Ultravioleta	33
4.5.2 Espectroscopia de Absorção no Infravermelho	34
4.5.3 Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear de ^1H e ^{13}C	34
4.6 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DO EXTRATO BRUTO E DAS FRAÇÕES	34
4.6.1 Método da Concentração Inibitória Mínima (CMI)	34
4.6.1.1 Preparo do inóculo	35
4.7 BIOENSAIOS DE ATIVIDADE ALELOPÁTICA	35
4.7.1 Bioensaios de germinação e crescimento	35
4.7.2 Índice Mitótico	36
4.7.3 Preparo do Material Vegetal para Testes de Atividade Enzimática	37
4.7.4 Atividade da Peroxidase	37
4.7.5 Atividade da catalase	37
4.7.6 Atividade da Polifenoloxidase	38
4.7.7 atividade da α -amilase	38

4.7.8 Teor de Clorofila e Respiração	39
4.7.9 Análise Estatística	39
4.8 ATIVAÇÃO DE NEUTRÓFILOS	40
4.8.1 Teste do NBT com PMA	40
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	42
5.1 ENSAIO SISTEMÁTICO DE ANÁLISE EM FITOQUÍMICA	42
5.2 DETERMINAÇÃO DO TEOR DE VOLÁTEIS	43
5.3 DETERMINAÇÃO DO TEOR DE CINZAS	43
5.4 RENDIMENTO NA EXTRAÇÃO	43
5.5 DETERMINAÇÃO DO TEOR DE SÓLIDOS	44
5.6 ANÁLISES CROMATOGRÁFICAS	44
5.6.1 Fração Diclorometano	47
5.6.2 Fração Acetato de Etila	48
5.7 ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DAS SUBFRAÇÕES ACETATO DE ETILA REUNIDAS 76 A 80	52
5.7.1 Resultado IR	59
5.8 RESULTADO ATIVAÇÃO DE NEUTRÓFILOS	59
5.9 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA	63
5.10 ATIVIDADE ALELOPÁTICA	64
5.10.1 Bioensaios de Germinação e Crescimento	64
5.10.2 Índice Mitótico	68
5.10.3 Atividade Enzimática	73
CONSIDERAÇÕES FINAIS	79
REFERÊNCIAS	81

1 INTRODUÇÃO

O Brasil é reconhecido mundialmente como um dos maiores detentores da biodiversidade do planeta. Dos dezesseis países considerados como “megadiversos”, que concentram 70% da biodiversidade global, o Brasil é apontado como possuidor da maior biodiversidade, contendo cerca de 20% de todas as espécies do planeta, ou seja, uma em cada cinco espécies vegetais do planeta ocorre no Brasil (BAGGIO; MEDRADO, 2009). Basta observar atentamente uma pequena área de vegetação nativa para que diferentes espécies sejam facilmente percebidas.

É muito provável que grande parte dessa variedade venha a desaparecer sem que tenhamos a chance de conhecer seus componentes químicos e as possíveis contribuições desses, como fármacos, pesticidas ou inseticidas naturais.

Dos ecossistemas do planeta, a Floresta Atlântica é um dos mais ameaçados (RANTA *et al.*, 1998), ocupando o quarto lugar numa lista de 25 *hot spots* para a conservação da biodiversidade no mundo (MYERS, 1998; MYERS *et al.*, 2000). Restam menos de 10% da sua área original (GOMES, 1998; MORELLATO, 2000). Esse ecossistema, por apresentar elevados índices de espécies endêmicas vem sofrendo sistemática ameaça de extinção.

O conhecimento sobre a maioria das espécies fica restrito aos dados empíricos e etnofarmacológicos, pois pouco se conhece a respeito das substâncias químicas responsáveis pelas ações farmacológicas. Muitas das espécies medicinais são exóticas, originárias da Europa, com técnicas de cultivo apropriadas daquela região, mas que ainda não foram adaptadas às condições climáticas brasileiras.

Segundo a Associação Brasileira da Indústria Fitoterápica (ABIFITO), dos 206 fitoterápicos registrados no país em 2003, 89% eram elaborados com plantas européias (SABINO, 2004). Apesar de serem utilizadas popularmente no Brasil cerca de 300 espécies, somente 10% são nativas. (GAZDA, 2009)

Segundo a resolução 07, de 23 de julho de 1996 do Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA), a vegetação de restinga é o conjunto de comunidades vegetais sob influência marinha e flúvio-marinha. Assim como o restante da Floresta Atlântica, tais comunidades também sofrem intensa degradação devido à expansão urbana e à exploração econômica (DAL FORNO, 2009). Na faixa de areia beira-mar

aparece uma vegetação denominada halófito-psamófito, ou seja, halófitos por serem adaptadas a altas concentrações salinas e psamófitas por serem também adaptadas a um substrato móvel (MANTOVANI, 2006 *apud* DAL FORNO, 2009).

Rocha e Moura (2009), em um estudo para a preservação de uma área de restinga, apontam para a falta de pesquisas sobre as espécies desse ecossistema e para a necessidade de conhecê-las, no intuito de preservação. Além disso, apontam que nesse ecossistema estão presentes espécies utilizadas na alimentação humana e de animais, assim como ornamentais e medicinais. Em um levantamento etnobotânico no litoral do Espírito Santo, Jesus (1997) afirma que o ecossistema de restinga tem grande potencial de plantas medicinais, e que há necessidade de estudos na área, já que cerca de 40% das espécies levantadas não haviam sido citadas na literatura específica.

A obtenção de novos fármacos e produtos bioativos a partir de produtos naturais tem maior chance de êxito devido à diversidade molecular ser superior à dos produtos sintéticos. Outra razão é porque os compostos químicos obtidos a partir de plantas têm funções biológicas, e esses organismos possuem metabolismo muito semelhante ao dos mamíferos (GUERRA; NODARI, 2007). O metabolismo secundário de vegetais superiores vem, ao longo de milhares de anos de evolução, se especializando na síntese de compostos orgânicos, com diversos tipos de atividade biológica em vegetais e animais. Extrair, isolar, identificar, estudar, conhecer e utilizar esse tesouro natural é uma oportunidade que deve ser aproveitada antes que muito da biodiversidade tenha se perdido ou reduzido significativamente. Acredita-se que apenas 5% das espécies existentes sejam estudadas antes que o restante de suas populações se extinga (GOTTLIEB; BORIN, 2007). A vegetação litorânea é uma das que mais sofre influência humana, com sua ocupação em todos os continentes, principalmente em países como o Brasil, cuja população encontra-se concentrada na faixa litorânea. Além disso, as mudanças climáticas, a possível elevação do nível do mar e o aumento da poluição dos rios e oceanos fazem com que esse ecossistema seja um dos primeiros a sofrerem danos irreversíveis como o desaparecimento de espécies.

A *Acicarpa spathulata* . (Robert Brown), é uma Calyceraceae endêmica da faixa de areia litorânea que se estende do litoral sul até o nordeste do país (SAMPAIO-SANTOS, 1996) e, portanto, é uma halófito-psamófito. Outra espécie do gênero *Acicarpa*, a *Acicarpa tribuloides* Juss., é descrita como de uso tradicional

pela população peruana e caribenha no controle de hemorragias, para problemas estomacais e dores de dentes (MACBRIDE, 1937). No Peru é conhecida pelo nome popular de “Estrella Kiska” da qual foram isolados 5 iridóides e seco-iridóides que apresentaram resultados positivos em testes para atividades biológicas, contração do íleo isolado de cobaia e ativação de macrófagos ativados (AQUINO *et al.*, 1996; MERALGEMAN *et al.*, 2006).

Um grande número de plantas, utilizadas com fins medicinais, possuem atividades relacionadas à presença de iridóides e seco-iridóides. Plantas medicinais contendo estes compostos são usadas como tônicos amargos para problemas digestivos, como sedativos, antipiréticos, cicatrizantes em problemas da pele e como hipotensivos (DINDA; CHOWDHURY; MOHANTA, 2009).

Tendo em vista fatores como a grande biodiversidade da Floresta Atlântica, o perigo do desaparecimento de muitas espécies, principalmente em ecossistemas como o de restinga que sofre ação constante do homem; aliado a necessidade de se conhecer as características químicas das espécies na busca de novos compostos que apresentem atividades biológicas; o potencial dos iridóides a serem utilizados como fármacos, inseticidas ou outros insumos; e a importância de pesquisar espécies endêmicas, por serem mais suscetíveis à extinção; somando-se ao fato do gênero *Acicarpa* já ter uma espécie com atividades biológicas descritas para alguns compostos isolados, objetivou-se, neste trabalho, realizar seu estudo fitoquímico e testar as atividades biológicas dos constituintes da *Acicarpa spathulata*.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Realizar um estudo fitoquímico e do potencial biológico de *Acicarpha spathulata*, por meio de testes de atividade antimicrobiana, alelopática e da capacidade de ativação de neutrófilos do extrato etanólico bruto, frações e compostos isolados.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ✓ Coletar e identificar botanicamente a espécie;
- ✓ Isolar e identificar os principais metabólitos de *A. spathulata* por meio de técnicas cromatográficas e recristalização;
- ✓ Determinar a estrutura química de compostos isolados utilizando técnicas espectroscópicas em UV, IV, RMN ¹H e ¹³C;
- ✓ Analisar a atividade alelopática das frações.
- ✓ Analisar a atividade antimicrobiana do extrato e das frações;
- ✓ Avaliar a capacidade de ativação de neutrófilos das substâncias isoladas.

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 PRODUTOS NATURAIS

A utilização de plantas como fonte de produtos terapêuticos acompanha a história da humanidade e, apesar do enorme desenvolvimento da síntese química, atualmente 25% das drogas prescritas no mundo são de origem vegetal. Entre 2001 e 2002 quase um quarto dos fármacos mais vendidos no mundo eram obtidos diretamente ou derivados de fontes naturais (BALUNAS; KINGHORN, 2005).

Trinta por cento das novas substâncias químicas descobertas entre 1981 e 2002 são produtos naturais ou derivados desses. Outros 20% dessas novas moléculas são produtos sintetizados mimetizando estruturas encontradas na natureza (BALUNAS; KINGHORN, 2005; NEWMAN *et al.*, 2003).

Diversos fatores têm impulsionado a busca de novas drogas de origem vegetal: a descoberta de drogas eficazes para o combate ao câncer; estudos sobre a biodiversidade e a preservação das espécies; falta de acesso da maioria da população aos medicamentos modernos, fazendo com que vias alternativas mais baratas sejam oferecidas (NEWMAN *et al.*, 2003).

Todavia, a falta de informação e o mau uso dos medicamentos podem provocar o aparecimento de reações colaterais graves ou então o insucesso do tratamento, causando descrença na sua eficácia. Acompanhando esses fatos, houve o ressurgimento de algumas práticas alternativas como: cromoterapia, florais, homeopatia, medicina chinesa, medicina ayurveda e outros, de eficácia duvidosa e que, muitas vezes, prometem milagres sem ocorrência de efeitos colaterais (CARVALHO, 2001).

A falsa crença na absoluta segurança de uso dos fitoterápicos é bastante disseminada. Há uma tendência em acreditar que tudo o que existe na natureza foi feito para satisfazer as necessidades humanas, não existindo riscos em seu consumo (CARVALHO, 2001).

A pesquisa e produção de novos fármacos a partir de plantas envolvem diversos campos do conhecimento e vários métodos de análise. Geralmente têm início com um botânico, etnobotânico ou ecólogo que coleta e identifica a planta.

Essa coleta habitualmente é realizada para plantas que podem ter algum composto ativo, pois estão relacionadas taxonomicamente às espécies com compostos ativos já conhecidos ou que são utilizadas na medicina popular de uma região (BALUNAS; KINGHORN, 2005).

Os fitoquímicos preparam os extratos dessa planta e submetem esse material à triagem biológica em ensaios farmacológicos. A presença de efeito farmacológico direciona o processo de isolamento do princípio ativo através do biomonitoramento pelos testes de atividade. Para a descoberta do mecanismo de ação desses compostos a biologia molecular disponibiliza ferramentas que permitem determinar os sítios celulares e ou fisiológicos envolvidos nesse processo. Isso demonstra que esse trabalho é necessariamente multidisciplinar e abrange todos os campos do conhecimento aqui citados (BALUNAS; KINGHORN, 2005).

3.2 A FAMÍLIA CALYCERACEAE

Segundo Bohm e Stuessy (2001), Calyceraceae é uma família de ocorrência restrita à América do Sul, compreendendo seis gêneros e 50 a 60 espécies. Rapini (2009) afirma que a família possui seis gêneros e cerca de 60 espécies restritas à América do Sul, sendo normalmente encontradas nas regiões andinas e antárticas, e acrescenta que no Brasil ocorrem dois gêneros e cerca de cinco espécies. Hellwig (2007) relata que, além de ocorrerem na porção continental da América do Sul, uma de suas espécies ocorre nas Ilhas Malvinas, sem citar qual (FIGURA 1).



FIGURA 1 – Mapa da Distribuição Geográfica da Família Calyceraceae
Retirado de www.freewebs.com/rapinibot/embriofitas/parte9.pdf, em 07/05/2009

3.2.1 Características Morfoanatômicas

As plantas da família Calyceraceae são perenes e raramente anuais, ocasionalmente sublignificadas, normalmente sem tronco ou ramos lignificados ou com botões florais escapiformes. Possuem folhas alternas, geralmente formando uma roseta na base, sem estípulas, sésseis ou presas a um pecíolo distinto. Podem apresentar margens lisas, sinuosas, dentada ou serrilhada. Possuem flores em capítulos rodeados por brácteas envoltórias triangulares a lanceoladas e sementes com endosperma bem desenvolvido (HELLWIG, 2007). As folhas possuem estômatos anomocíticos presentes em ambas as faces. Possuem frutos secos, indeiscentes do tipo aquênio (WATSON, 2010).

A família contém muitas espécies que formam rosetas vegetativas até a inflorescência formada. Crescem a partir de estolões, rizomas ou brotos laterais provenientes das partes inferiores da planta. Nas plantas do gênero *Acicarpa* os capítulos são terminais e o desenvolvimento se dá a partir do brotamento de eixos secundários, que se sobressaem em relação àqueles que os procedem (HELLWIG, 2007).

Segundo Rapini (2009), as plantas da família Calyceraceae são ervas anuais, bianuais ou perenes, raramente subarbustos e também raramente pubescentes, que não apresentam estípulas e possuem folhas inteiras ou pinadamente lobadas e alternas, freqüentemente em rosetas simples. Apresentam inflorescências terminais

em escapo ou axilares, capítulos solitários ou em panículas cimosas, capítulos envoltos por brácteas involucrais e receptáculo plano ou cônico. Flores bissexuadas, actinomorfas, raramente zigomorfas e epíginas. Sépalas, conatas, iguais ou desiguais entre si, aumentadas e espinescentes na frutificação ou não. Pétalas, conatas, infundibuliformes, com prefloração valvar; androceu isostêmone, filetes condescidos em tubo, 4 a 5 glândulas elípticas e anteras coniventes ou às vezes condescidas na base e introrsas; ovário bicarpelar, unilocular, uniovulado; estilete terminal, indiviso, filiforme, mais espessado em direção ao ápice, estigma subcapitado; fruto aquênio, cálice persistente, livres entre si ou condescidos, formando infrutescência globoso-espinescente. O gênero *Acicarpha* possui flores periféricas bissexuadas e as centrais masculinas.



FIGURA 2 – Fotos da *A. spathulata* no local de coleta.

3.2.2 Sistemática e Quimiosistemática

A Calyceraceae é uma família pertencente à super ordem Corniflorae, da ordem das Dipsacales. Segundo Sampaio-Santos e colaboradores (1999) Dipsacales é uma ordem iridoídica caracterizada por produzir seco-iridóides, triterpenos, esteróides e flavonas. Os iridóides carbocíclicos são biossintetizados por todas as ordens de Corniflorae com exceção das Sarraceniales, onde os seco-iridóides são rearranjados estruturalmente, as ordens Cornales e Dipsacales, da qual pertencem as Calyceraceae, produzem os dois tipos. (SAMPAIO-SANTOS; KAPLAN, 1997).

Estudos indicam que Calyceraceae juntamente com Campanulaceae e Goodeniaceae são os representantes mais próximos das Asteraceae. (BREMER *et al.*, 1994; BOHM, 2001).

3.2.3 Estudos Químicos e Biológicos na família Calyceraceae

A família Calyceraceae tem como características químicas a produção de iridóides, além de estocarem carboidratos na forma de inulina. Os gêneros *Acicarpha* e *Calycera*, encontrados no Brasil, possuem fruto encerrado em um cálice de espinhos. (RAPPINI, 2009)

Como já citado, existe uma relação entre a família Calyceraceae e a Asteraceae (BOHM, 2001), porém as Calyceraceae não produzem taninos, ácido elágico, látex e nem compostos característicos das Asteraceae como os poliacetilenos e lactonas sesquiterpênicas (RAPPINI, 2009).

Estudos fitoquímicos realizados com *Acicarpha tribuloides* Juss., planta utilizada na medicina tradicional do Peru, tornou possível o isolamento de cinco iridóides e bisiridóides, sendo eles: secologanina, ácido suerosídico, secoxiloganina I e II e silvestrosídeo III (AQUINO *et al.*, 1996). Recentemente, Meralgeman (2006) isolou um seco-iridóide não glicosilado, denominado tribulolídeo, e duas cromonas naturais assim como dois outros seco-iridóides previamente identificados.

Alguns autores relatam o potencial biológico de espécies representantes da família. Almeida *et al.* (2001), em estudos com as partes aéreas da *Acicarpha tribuloides*, verificaram que os extratos na concentração de 50 µg possuem atividade analgésica central. Resultados similares foram obtidos por Aquino *et al.* (1996), sendo que as frações clorofórmio/metanol, metanol e n-butanol demonstraram efeitos analgésicos significativos em ratos, pois reduziram as contrações do íleo isolado de cobaias, induzidos eletricamente.

3.3 A ESPÉCIE ACICARPHA

A *Acicarpha spathulata* R.Br é uma Calyceraceae, descrita pela primeira vez em 1818 por R. Brown. Está presente nas restingas do Brasil de Santa Catarina até a Bahia, onde é conhecida como “roseta” ou “carrapicho-de-praia” (SAMPAIO-SANTOS *et al.*, 1999). Ocorre no cordão arenoso, entre a linha de praia e as dunas, não apresentando distribuição espacial bem definida (BOEGER, 2006).

Acicarpha spathulata é uma halófita-psamófita adaptada às condições peculiares do ambiente, o que deve resultar em características morfológicas e metabólicas também peculiares. As plantas são consideradas halófitas por apresentarem tolerância ao sal e psamófitas pela tolerância à alta mobilidade do substrato. Além disso, os ambientes onde ocorrem normalmente apresentam baixa disponibilidade de matéria orgânica, drenagem rápida da água, luz solar direta e intensa causando superaquecimento durante algumas horas do dia, principalmente nos meses mais quentes (BOEGER, 2006).

Sampaio-Santos e colaboradores (1999) descrevem que *A. spathulata*, pertence a uma ordem iridoídica, conhecida como Dipsacales, que é caracterizada por produzir seco-iridóides, triterpenos, esteróides e flavonas. Neste mesmo trabalho eles identificaram após a purificação do extrato hexânico, Δ^{12} -oleanano, acetato de lupeoila e acetato de oleanila. Da fração hexânica do extrato metanólico identificaram sitosterol, estigmasterol e a presença de outros esteróides; da fração diclorometânica identificaram ácido oleanólico e na fração butanólica foi demonstrada a presença de iridóides, porém estes não foram identificados.

3.4 ATIVIDADES BIOLÓGICAS ATRIBUÍDAS AOS IRIDÓIDES

Iridóides são metabólitos encontrados em várias famílias de plantas, geralmente em glicosilados. A estrutura destes compostos é formada pela ciclização alternativa do pirofosfato de geranila, ou seja, trata-se de monoterpénóides ciclopentano pirano (SAMPAIO-SANTOS *et al.*, 2001). Quimiotaxonomicamente e biogeneticamente estes compostos proporcionam a ligação estrutural entre terpenos e alcalóides (DINDA *et al.*, 2007). Sob o aspecto biogenético, os iridóides são biossintetizados a partir do cátion iridoidal e diversificam-se em 27 vias diferentes (SAMPAIO-SANTOS *et al.*, 2001). A figura 3 mostra um bi-cíclico H-5/H-9b, o sistema de anéis ciclopentanopirano fundido em β com conformação *cis* é a estrutura mais comum desses compostos. A clivagem do anel ciclopentano dos iridóides produz os seco-iridóides e a clivagem do anel pirano produz alguns derivados de iridóides (Figura 3). (DINDA *et al.*, 2007).

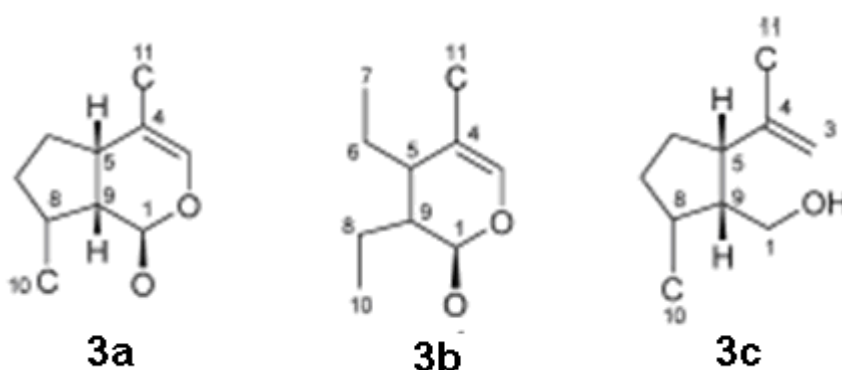


FIGURA 3 – Esqueleto básico e numeração de iridóides (3a), seco-iridóides (3b) e derivados (3c).

Pelo seu amplo espectro no uso popular, foram realizados vários estudos que revelaram bioatividade cardiovascular, anti-hepatotóxica, colerética, purgativa, anti-inflamatória, antiespasmótica, antitumoral, antiviral, e também como imunomodulador, hipoglicemiante e hipolipedêmica (DINDA, 2009).

Os exemplos de estudos com bioatividades encontradas em iridóides isolados de diferentes espécies é muito elevado, alguns exemplos mais relevantes são os dois iridóides isolados da *Patrínia rupestris* por Yuan, Yang, e Jia em 2006 que possuem atividade antimicrobiana frente sepas de *E. coli* e *S. aureus* equivalente ao cloranfenicol (YUAN; YANG; JIA, 2006).

Zuleta e colaboradores (2003) isolaram três seco-iridóides inéditos da *Calycophyllum spruceanum*, juntamente com outros dois iridóides e 3 seco-iridóides conhecidos e demonstraram atividade antitripanossômica da secoxiloganina (ZULETA *et al.*, 2003).

Koca e colaboradores (2011) demonstraram atividade cicatrizante em feridas de ratos e camundongos do extrato aquoso de *Olea europeaceae*, rico em oleuropeína, além da atividade antioxidante.

Tzakou (2007) demonstrou a atividade inseticida contra formigas *Crematogaster scutellaris* e cupins *Kaloterme flavicollis* de sete iridóides glicosídeos isolados de *Galium melanantherum*.

Os iridóides longifoliosídeo A e B, isolados de *Veronica longifolia* demonstraram atividade antioxidante contra óxido nítrico (NO), superóxido (SO) e radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH) equivalente aos compostos padrão quercetina, ácido ascórbico e hidroxianisol butilado (BHA) (JENSEN, 2010).

3.5 ALELOPATIA: CONCEITO E HISTÓRICO

Dentre os métodos de controle e prevenção de plantas daninhas, o uso de agroquímicos continua sendo o componente mais importante na hora de aumentar o rendimento das colheitas e reduzir o trabalho nas culturas. No entanto, o uso continuado de herbicidas em áreas de monocultivo tem levado ao crescente aparecimento, em nível mundial, de biótipos de plantas daninhas tolerantes e resistentes a esses herbicidas o que tem ocasionado um aumento significativo dos custos de produção e problemas graves de contaminação do ambiente (MACIAS *et al.*, 2000a).

Nesse contexto, as milhares de substâncias químicas disponíveis na natureza, quer aquelas produzidas por plantas ou pelos microorganismos, podem oferecer novas e excelentes oportunidades para diversificar o controle de endemias na agricultura, reduzindo ou eliminando a contaminação do ambiente, preservando os recursos naturais e garantindo a oferta de produtos agrícolas com alta qualidade, desprovidos de resíduos de agentes contaminantes (SOUZA-FILHO; ALVES, 2002).

O primeiro registro da influência que uma planta tem sobre a outra, interferindo no seu desenvolvimento, foi descrito por Theophrastus (300 a.C.), um discípulo de Aristóteles, que observou que plantas de grão-de-bico (*Cicer arietinum* L.) não revigoravam o solo como outras plantas, ao contrário, exauriam-no, ao mesmo tempo em que destruíam as plantas invasoras (RICE, 1984).

Plínio (1 d.C.) reporta que o grão-de-bico (*Cicer arietinum* L.), a cevada (*Hordeum vulgare* L.), a ervilha (*Vicia ervilia* (L.) Willd) e a noqueira européia, (provavelmente *Juglans regia* L.), foram causa de muitas preocupações para o homem e injúrias para as plantas da vizinhança. Deixou também registrada a observação que, sob a copa das plantas do gênero *Pinus*, o capim morria (RICE, 1984).

De Candolle, em 1932, afirmava que o cansaço das terras decorrente da monocultura durante anos seguidos, era ocasionado pelo acúmulo de algumas substâncias exsudadas pelas plantas a qual passava a afetar o próprio desenvolvimento (RICE, 1984).

Em 1937 o termo alelopatia foi proposto por Hans Molish, palavra derivada do latim *Allelon* = de um para o outro, *pathos* = prejuízo, para referir-se a interações bioquímicas entre todos os tipos de plantas e inclusive entre microorganismos. Anos depois, o mesmo autor redefiniu o termo alelopatia como sendo “qualquer efeito direto ou indireto danoso ou benéfico que uma planta (incluindo microorganismos) exerce sobre outra pela produção de compostos químicos liberados no ambiente” (RICE, 1984).

A Sociedade Internacional de Alelopatia foi criada em 1996 e definiu o termo como a “ciência que estuda qualquer processo envolvendo, essencialmente, metabólitos secundários produzidos por plantas, algas, bactérias e fungos que influenciam o crescimento e desenvolvimento de sistemas agrícolas e biológicos, incluindo efeitos positivos e negativos” (MACIAS *et al.*, 2000b).

A alelopatia é um importante mecanismo ecológico, que influencia a dominância e a sucessão das plantas, cujas interações são responsáveis pelo estabelecimento e sobrevivência de espécies no ambiente. A inibição/estímulo resulta da interferência isolada ou coletiva nos processos fisiológicos, sendo por isso considerados como um recurso para o desenvolvimento de pesticidas naturais (GATTI *et al.*, 2004). Os procedimentos usados para avaliar o potencial de atividade alelopática são os bioensaios, nos quais podem ser avaliados parâmetros globais

como germinação, crescimento e desenvolvimento das plântulas ou plantas adultas e parâmetros mais específicos como a atividade de alguns processos fisiológicos como, por exemplo, fotossíntese, respiração, conteúdo de clorofila, entre outros (SOUZA-FILHO; ALVES, 2002).

Os efeitos alelopáticos dependem dos compostos químicos, que são liberados no ambiente pelas plantas doadoras. Dessa forma, a alelopatia distingue-se da competição, pois essa envolve a redução ou a retirada de algum fator do ambiente, necessário à outra planta no mesmo ecossistema, tal como água, luz e nutrientes (RICE, 1984). Por ser um fenômeno que ocorre largamente em comunidades de plantas, a alelopatia é um dos mecanismos por meio dos quais determinadas plantas interferem no desenvolvimento de outras, alterando o padrão e a densidade (SMITH; MARTIN, 1994).

3.5.1 Natureza e função dos compostos alelopáticos.

As interações alelopáticas derivam de metabólitos secundários produzidos por plantas e microorganismos, que são conhecidos como aleloquímicos. Estes aleloquímicos são produtos naturais bioativos que conduzem à larga ordem de efeitos biológicos (MACIAS *et al.*, 2006). Essas substâncias estão presentes em todos os tecidos das plantas incluindo folhas, flores, frutos, raízes, rizomas, caules e sementes (PUTNAN; TANG, 1986), e variam em quantidade e qualidade de espécie para espécie, até mesmo na quantidade do metabólito de um local de ocorrência ou ciclo de cultivo para outro, pois muitos deles possuem suas sínteses desencadeadas por eventuais vicissitudes a que as plantas estão expostas (FERREIRA; AQUILA, 2000).

Durante muito tempo não se sabia exatamente se as substâncias químicas do metabolismo secundário representavam o produto final do metabolismo celular, ou se eram sintetizadas pelas plantas com funções específicas. Alguns autores defendiam a primeira hipótese, baseados no fato de que essas substâncias encontravam-se em maior quantidade nos vacúolos das células, onde seriam depositadas a fim de evitarem a própria autotoxicidade. Outros consideravam que a produção dessas substâncias era regida pelas leis da genética e que estavam sendo

constantemente sintetizadas pelas plantas, defendendo a segunda hipótese (MEDEIROS, 1990).

Atualmente, entretanto, sabe-se que muitas destas substâncias estão diretamente envolvidas nos mecanismos que permitem a adequação do produtor a seu meio. De fato, já foram reconhecidas como funções de várias substâncias pertencentes a essa classe de metabólitos, por exemplo, a defesa contra herbívoros e microorganismos, a proteção contra raios UV, a atração de polinizadores ou animais dispersores de sementes e em alelopatia (SANTOS, 2002).

Dessa forma, os aleloquímicos são vistos como alternativas para agroquímicos sintéticos, objetivando o manejo sustentável e ecológico na produção agrícola. Muitas substâncias alelopáticas apresentam grande potencial para uso no controle biológico de plantas daninhas (CHUNG *et al.*, 2001), sendo parcial ou totalmente solúveis em água e ativas em baixas concentrações. Em contrapartida ao poder fitotóxico, os efeitos de promoção da germinação e do crescimento vegetal causados por aleloquímicos também são de interesse para o manejo agrícola (VYVYAN, 2002).

A síntese dos metabólitos secundários de plantas deriva, principalmente, do metabolismo da glicose via dois intermediários principais: ácido chiquímico e acetato (Figura 4).

A via do ácido chiquímico (chiquimato) produz três aminoácidos aromáticos: fenilalanina, triptofano e tirosina, que intermediam a biossíntese de numerosos produtos naturais aromáticos em plantas superiores (SCHMID; AMRHEIN, 1995) entre eles, os alcalóides, taninos, lignanas, ligninas e cumarinas. Os metabólitos secundários podem ser encontrados na forma livre, sendo denominados genericamente de agliconas ou estar ligado a uma ou mais unidades de açúcar formando o que se denomina heterosídeos (SANTOS, 2002).

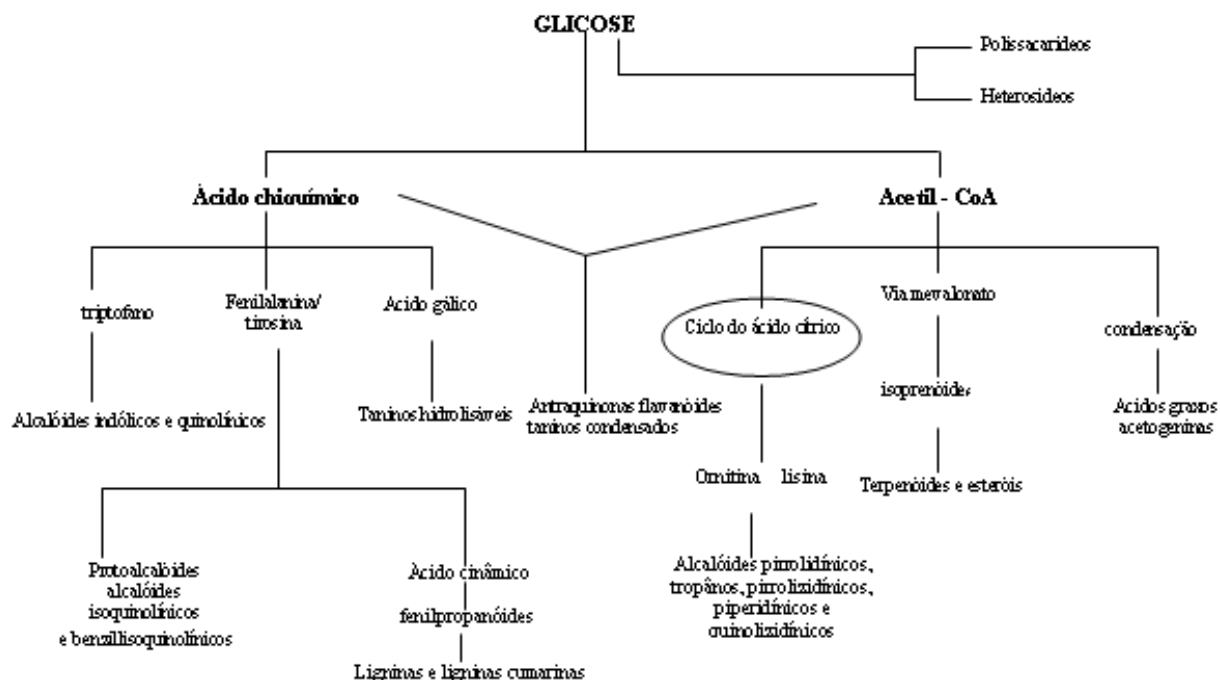


FIGURA 4 – Ciclo biossintético dos metabólitos secundários.
Fonte Santos, 2002.

Metabólitos secundários às vezes agem como aleloquímicos, no entanto, o termo aleloquímico e metabólito secundário não devem ser usados como sinônimos. Um composto químico pode apresentar vários papéis na natureza, incluindo o de aleloquímico, dependendo do organismo e do parâmetro ambiental específico que afeta o organismo. Assim, um mesmo composto pode às vezes ser um aleloquímico, e outras vezes pode apresentar outros papéis (INDERJIT; DUKE, 2003).

3.5.2 Vias de liberação e fatores que afetam a produção de aleloquímicos.

Os compostos alelopáticos podem ser liberados das plantas por lixiviação a partir dos tecidos, volatilização, exsudação pelas raízes e decomposição de resíduos da planta, do seguinte modo:

- **lixiviação:** as toxinas solúveis em água são lixiviadas da parte aérea e das raízes ou, ainda, dos resíduos vegetais em decomposição (ALMEIDA, 1988). Pode-se citar, principalmente, a lixiviação dos ácidos orgânicos, açúcares, aminoácidos, substâncias pécticas, terpenóides, alcalóides, compostos fenólicos e giberelina (SOUZA, 1988; RODRIGUES *et al.*, 1992);

- **volatilização:** compostos aromáticos são volatilizados das folhas, flores, caules e raízes e podem ser absorvidos por outras plantas. Nesse grupo, encontram-se compostos como o gás carbônico (CO_2), a amônia (NH_3), o etileno e os terpenóides. Esses últimos atuam sobre as plantas vizinhas por meio dos próprios vapores ou condensados no orvalho ou, ainda, alcançam o solo e são absorvidos pelas raízes (SOUZA, 1988; WEIDENHAMER, 1996).
- **Exsudação pelas raízes:** um grande número de compostos alelopáticos é liberado na rizosfera circundante e pode atuar direta ou indiretamente nas interações planta/planta e na ação de microrganismos (TUKEY JÚNIOR, 1969). Entre esses compostos, podem ser citados o ácido oxálico, a amidalina, a cumarina e o ácido transcinâmico (SILVA, 1978);
- **Decomposição de resíduos:** toxinas são liberadas pela decomposição das partes aéreas ou subterrâneas, direta ou indiretamente, pela ação de microrganismos. Perdas da integridade de membranas celulares permitem a liberação de um grande número de compostos que impõem toxicidade aos organismos vizinhos, tais como os glicosídeos cianogênicos (SOUZA, 1988), ácidos fenólicos, agropireno, cumarinas (SILVA, 1978) e flavonóides (RICE, 1984).

As substâncias alelopáticas ainda se mantêm nos tecidos das plantas mesmo depois de mortas, de onde são liberadas por volatilização, se forem produtos voláteis, ou por lixiviação, por meio do orvalho e chuva, se forem solúveis na água, sendo arrastadas para o solo, onde, ao atingirem a concentração necessária, podem influenciar no desenvolvimento dos microrganismos e das plantas que nele se encontram. Nesse sentido, o efeito alelopático pode se pronunciar tanto durante o ciclo de cultivo, quanto nos cultivos subseqüentes (TEXEIRA *et al.*, 2004).

3.5.3 Mecanismos de ação dos compostos alelopáticos

Aleloquímicos alteram o crescimento e o desenvolvimento de plantas pela multiplicidade de ações sobre os processos fisiológicos. Há centenas de diferentes estruturas e muitos dos compostos químicos apresentam vários efeitos fitotóxicos (EINHELLIG, 2002).

Entretanto, os mecanismos de ação desses compostos ainda não estão completamente esclarecidos. Sabe-se que os mesmos afetam processos, tais como a germinação das sementes e o crescimento das plântulas, a assimilação de nutrientes, a fotossíntese, a respiração, a síntese de proteína, a atividade de várias enzimas e a perda de nutrientes pelos efeitos na permeabilidade da membrana celular (DURIGAN; ALMEIDA, 1993; EINHELLIG, 1996).

3.5.4 Principais classes de agentes alelopáticos

Rice (1984) classifica os compostos aleloquímicos em 14 categorias, sendo elas: ácido cinâmico e seus derivados, cumarinas, fenóis simples, derivados do ácido benzóico e ácido gálico, flavonóides, taninos condensados e hidrolisados, terpenóides e esteróides, ácidos orgânicos solúveis em água, lactonas simples insaturadas, ácidos graxos de cadeia longa, naftoquinonas, antraquinonas e quinonas, aminoácidos e poliptídeos, alcalóides e cianoidrinas, glicosídeos, purinas e nucleosídeos.

Sabe-se que uma mesma planta é capaz de produzir diversos aleloquímicos e que entre estes se desencadeiam diversas interações. Muitos compostos são volatilizados ou liberados pela exudação das raízes, sendo lixiviados para o solo a partir de plantas vivas ou mediante resíduos em decomposição. Alguns compostos que chegam no ambiente atuam diretamente na inibição de germinação ou crescimento das espécies receptoras, porém, outros apresentam propriedades alelopáticas apenas após transformações químicas proporcionadas pelos microrganismos presentes no solo, demonstrando com isso que a atividade biológica pode ser potencializada por seus produtos de degradação (DUKE, 2002).

Ácidos fenólicos e flavonóides estão amplamente distribuídos nos tecidos vegetais e freqüentemente são associados a fenômenos alelopáticos. A maior parte dos estudos realizados tem tido como objetivo estabelecer os mecanismos de ação dessas duas classes de compostos. Ácidos fenólicos são mencionados como responsáveis pela redução de absorção de micro e macronutrientes em diversas espécies. Ácido ferúlico pode atuar na inibição da absorção de fosfato enquanto que ácido clorogênico pode alterar o balanço de nutrientes nas plantas. Os flavonóides

naringenina, genisteína e canferol também interferem de maneira indireta (SANTOS; REZENDE, 2008).

3.5.5 Defesa vegetal.

Muitos são os tipos de estresses que os vegetais podem enfrentar como oscilações drásticas de temperatura, umidade, radiação solar, ataque de pestes ou patógenos, dentre outros. As plantas conseguem mudar a constituição de compostos moleculares, como um mecanismo de resposta e muitas dessas alterações podem estar diretamente relacionadas com defesa e proteção. Para sobreviver, durante sua evolução, os vegetais desenvolveram mecanismos de resposta contra danos e doenças que, quando acionados, reconhecem a agressão. (SHEWRY; LUCAS, 1997; DE WIT, 2007).

Uma das principais revelações das pesquisas sobre defesa vegetal é que a resistência patógenos é usualmente complexa e tem como base a ação combinada de diversos fatores e não apenas um componente. Uma distinção fundamental é geralmente feita entre defesas pré-existentes ou constitutivas das plantas, e sistemas induzidos por agressão. As defesas vegetais podem ser também classificadas como estruturais baseadas em características anatômicas, e químicas quando relacionadas a compostos biologicamente ativos (SHEWRY; LUCAS, 1997).

A defesa estrutural é encontrada nas mais diversas partes da planta. A presença de pêlos, espinhos, tricomas e ceras, recobrando principalmente a superfície de caules e frutos são exemplos típicos dessas estruturas (BOWLES, 1990).

Dentre as substâncias relacionadas à defesa química, destacam-se aminoácidos não protéicos, alcalóides, fenóis, saponinas, lectinas, RIPs (proteínas inativadoras de ribossomos) quitinases, glucanases, flavonóides, inibidores de proteases e alergenos (BOWLES, 1990).

Em plantas, a produção de ERO é favorecida por vários fatores ambientais de estresse como a exposição a níveis elevados de luminosidade seca, metais pesados, alta concentração de sais, extremos de temperatura, radiação UV, poluição

do ar, herbicidas, estresse físico e mecânico e também como resposta a estresses bióticos tais como o ataque de patógenos (MALLICK; RAI, 1999).

Algumas ERO são classificadas como radicais livres por apresentarem elétrons desemparelhados na sua estrutura, fazendo com que reajam avidamente com moléculas biológicas, como DNA, proteínas e lipídeos, podendo alterar suas funções. O efeito final gerado depende não só do compartimento que está sendo afetado, mas do tipo de ERO que está reagindo (DROGE, 2002).

As ERO são formadas em etapas de redução univalente a partir do oxigênio molecular. O primeiro passo na redução de O_2 produz radicais com vida relativamente curta, os superóxidos. Esses radicais de oxigênio não conseguem atravessar membranas biológicas, ficando confinados no compartimento onde foram gerados. Os superóxidos formam hidroxiperoxídeos com duplas ligações (enos) ou duplas ligações alternadas (dienos), além de oxidar aminoácidos específicos, como metionina, histidina e triptofano. O superóxido também pode causar peroxidação de lipídeos no ambiente celular e nas membranas celulares (BREUSEGEM *et al.*, 2001). Posteriormente, a redução do oxigênio gera peróxido de hidrogênio (H_2O_2), que, apesar de não ser um radical livre, atravessa as biomembranas e se distribui a partir do local de sua produção (BREUSEGEM *et al.*, 2001).

A última e mais reativa espécie a ser formada nessa reação é o radical hidroxil (OH.). Esse radical é formado pela redução do H_2O_2 por íons metálicos (Fe^{2+} e Cu^{2+}) na reação de Fenton e tem grande afinidade por moléculas biológicas em seu sítio de produção. O hidroxil apresenta uma meia-vida muito curta, pois reage muito rapidamente com moléculas biológicas, seqüestrando aleatoriamente um átomo de hidrogênio (BREUSEGEM *et al.*, 2001; NORDBERG & ARNER, 2001) Figura 1.

As plantas protegem suas células e compartimentos sub-celulares dos efeitos citotóxicos das ERO com o auxílio de enzimas antioxidantes, como superóxido dismutase (SOD), ascorbato peroxidase (APX), glutathione redutase (GSH), peroxiredoxina (Prx), catalase (CAT), polifenol oxidase (PPO) e metabólitos, como a glutathione, ácido ascórbico, α -tocoferol e carotenóides (SCANDALIOS, 1993; INZE; MONTAGU, 1995; MITTLER, 2002) (Figura 5).

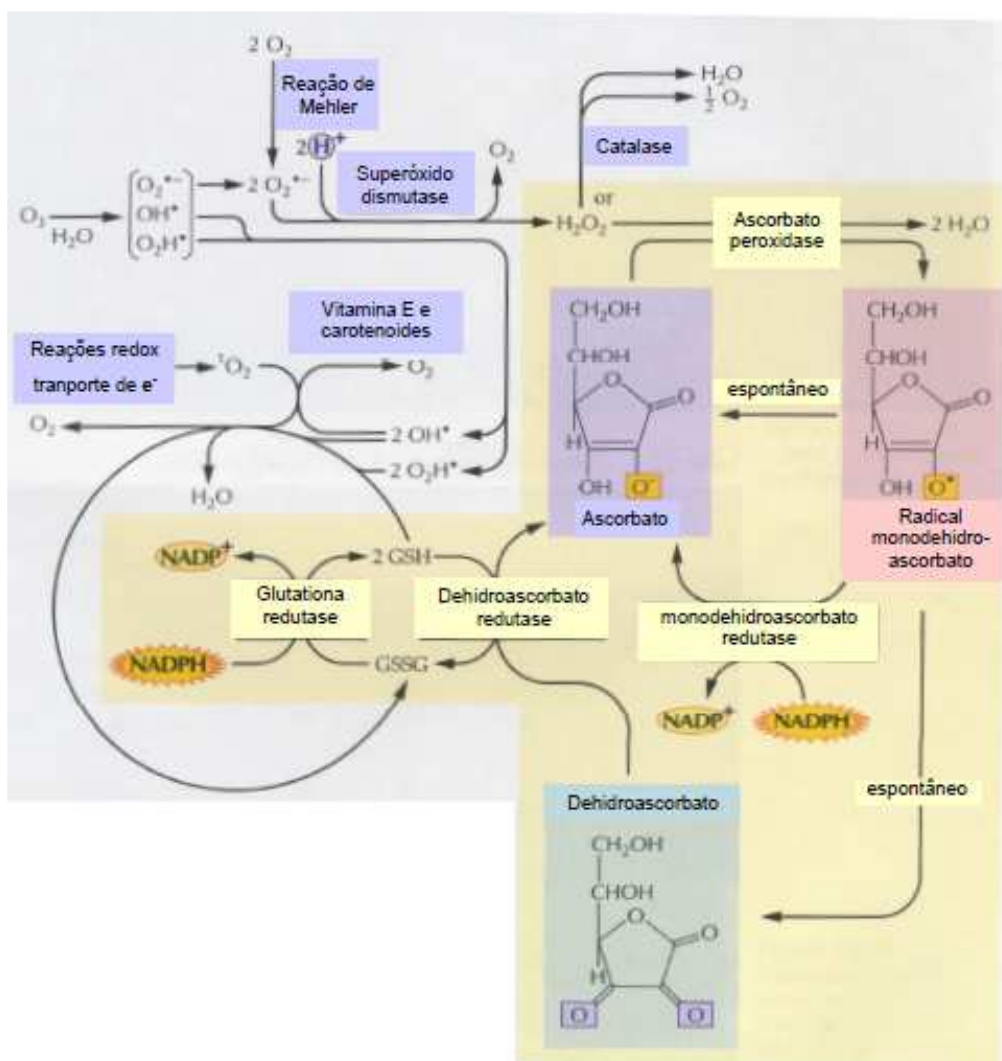


FIGURA 5 – Sistema antioxidante de defesa composto por componentes enzimáticos e não enzimáticos. Em amarelo, o ciclo ascorbato-glutationa. Adaptado de Buchanan *et al.* (2000).

As enzimas antioxidantes contribuem na resposta de plantas ao estresse. Como exemplos pode-se citar que: (1) em *Nicotiana plumbaginifolia* (tabaco), a expressão da Cu/Zn-SOD é aumentada preferencialmente pelo choque térmico e congelamento (Tsang *et al.* 1991); (2) nos tecidos infectados de plantas, uma redução da atividade da catalase levaria a um aumento de peróxido de hidrogênio, que poderia provocar a morte celular, que caracteriza a resposta de hipersensibilidade (HR), (MARGIS-PINHEIRO *et al.*, 1999); (3) Jung (2004) demonstrou que a atividade peroxidase aumenta cerca de 100 vezes, sete dias após o tratamento de folhas de *Arabidopsis thaliana* com metil jasmonato.

3.6 ATIVIDADES ANTIMICROBIANA

A tradicional antibioticoterapia está caminhando para uma crise de ineficácia devido à resistência bacteriana aos agentes antimicrobianos, o que aumenta consideravelmente a procura por novas e eficazes substâncias com essa atividade. A investigação química de extratos de plantas e produtos naturais para atividade antimicrobiana tem demonstrado que plantas superiores representam uma fonte potencial de novos agentes anti-infecciosos (STEIN, 2005; HEEMANN *et al.*, 2006).

Dias e colaboradores (2006) demonstraram ação antibacteriana no extrato bruto etanólico de flores de *A. lanceolatus* contra *Streptococcus pyogenes*. Testando a concentração inibitória mínima, demonstraram que o extrato bruto etanólico de caules e folhas desta espécie inibiu o crescimento de todas as bactérias testadas e que 1,48 mg / ml do referido extrato inibiu o desenvolvimento de *S. typhimurium* e *S. pyogenes*.

3.7 ISOLAMENTO E PURIFICAÇÃO POR CLAE – SEMIPREPARATIVA

Semi-preparativa é um termo aplicado para colunas de CLAE com diâmetro interno de 8 a 16 mm normalmente empacotadas com partículas maiores do que as usadas nas colunas analíticas, por volta dos 10 µm, e que são muito úteis para a separação na faixa de 1 a 100 mg da mistura de compostos (DÉCOSTERD *et al.*, 1987).

A técnica de separação por CLAE semipreparativa é uma técnica utilizada para isolar e purificar compostos em uma mistura. Em um sistema de CLAE analítico a amostra aplicada é normalmente muito pequena quando comparada à quantidade de fase estacionária presente na coluna, geralmente menos de 1:10000, e com isso pode-se obter uma ótima separação dos compostos (AGILENT TECHNOLOGY, 2010).

Em um estudo comparativo entre a eficiência da cromatografia contracorrente e a CLAE preparativa no isolamento e purificação de compostos fenólicos da *Magnoliae officinalis*, Yanbin e colaboradores (2006) concluíram que as duas

técnicas têm alta eficiência de separação, e que apesar da cromatografia em contracorrente apresentar recuperação maior e menor consumo de solvente, esta utiliza solventes mais tóxicos que a CLAE.

Haoyu e colaboradores (2010) utilizaram técnica de CLAE com coluna semi-preparativa para refinar a barbigerona, um rotenóide com atividade antitumoral. Utilizando uma coluna cromatográfica semi-preparativa e uma fase móvel composta por metanol e solução aquosa de ácido fórmico 0,1% na relação de 7:1, partiram da barbigerona com 87,7% de pureza e obtiveram uma pureza final de 99%, com recuperação de 93,1% (HAOYU YE, 2010).

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 OBTENÇÃO DO MATERIAL BOTÂNICO

Amostras da planta foram coletadas no litoral norte de Santa Catarina e litoral do Paraná. Foram separadas as raízes das partes aéreas, talos, folhas e inflorescências e o montante total foi de 1,8 Kg da planta fresca. Uma exsicata foi preparada e identificada no Museu Botânico de Curitiba. A planta não ficou arquivada, pois o museu possui uma exsicata recente e em ótimo estado, sob o número MBM 353511.

Cerca de 6g da planta fresca foi separada para a determinação do teor de voláteis, por perda por dessecação em balança halógena, e o restante das amostras foi seco em estufa a 45°C por 48 horas para sua estabilização, resultando em 990g da droga seca. Em seguida a droga vegetal foi moída em moinho de martelos. Cerca de 90 g de material vegetal foram utilizados para a realização dos ensaios físico-químicos, determinação do teor de voláteis na droga seca por perda por dessecação em balança halógena, teor de cinzas e ensaio fitoquímico sistemático.

4.2 ENSAIO SISTEMÁTICO DE ANÁLISE EM FITOQUÍMICA

Este ensaio analisa todas as características qualitativas dos principais grupos químicos que constituem os princípios ativos das drogas vegetais, utilizando em cada caso reações de coloração e / ou precipitação.

Foi realizado o ensaio fitoquímico sistemático de análise fitoquímica, de acordo com Moreira (1979), pelo método de maceração, extrato aquoso a 20% e extrato hidroalcoólico a 20% do vegetal em estudo. A partir desses extratos foi determinado o resíduo seco e a presença dos seguintes grupos químicos:

- Extrato hidroalcoólico: glicosídeos flavônicos, alcalóides, esteróides e/ou triterpenos, aminogrupos, glicosídeos cumarínicos e glicosídeos antraquinônicos.

- Extrato aquoso: glicosídeos antociânicos, saponinas, glicosídeos cianogênicos taninos condensados e hidrolisáveis, aminogrupos e flavonóides.

4.2.1 Preparo do extrato hidroalcoólico a 20%

A extração foi realizada por maceração de 40g das partes aéreas de *A. spathulata* . secas e trituradas em 200 mL de álcool etílico a 70% em banho-maria a 70° C por 90 minutos. Após 24 horas o macerado foi filtrado por meio de papel de filtro e volume completado com o mesmo solvente até 200 mL. O extrato foi mantido sob refrigeração até a realização dos ensaios fitoquímicos.

4.2.2 Preparo do extrato aquoso a 20%

A extração foi realizada em banho-maria a 70°C por 90 minutos de 40g das partes aéreas de *A. spathulata* . seca e triturada em 200 mL de água destilada. Após 24 horas o macerado foi filtrado por meio de papel de filtro e volume completado com água destilada até 200 mL e mantido sob refrigeração até a realização dos ensaios fitoquímicos.

4.2.3 Pesquisa de alcalóides

Esta pesquisa foi realizada utilizando-se os reativos gerais de alcalóides (Mayer, Dragendorff, Bouchardart e Berthrand) da seguinte forma: levou-se à secura 50 mL de extrato hidroalcoólico em banho-maria a 70%, seguido de dissolução do resíduo em 1 mL de etanol e 20 mL de ácido clorídrico a 1%. Transferiu-se o extrato clorídrico para 5 tubos de ensaio (1 mL em cada tubo) e adicionou-se em cada um os reativos, mantendo o quinto tubo como branco. O aparecimento de precipitado

indicou reação positiva. Para contraprova, 15 mL do extrato hidroalcoólico foram transferidos para um funil de separação e alcalinizados com hidróxido de amônio até pH 10. Efetuou-se extração com a mistura éter / clorofórmio (3:1) e submeteu-se o extrato às mesmas reações de alcalóides.

4.2.4 Pesquisa de ácidos orgânicos

O excedente da solução etérea da pesquisa de alcalóides foi levado à secura e redissolvido em 5 mL de água destilada. O pH ácido desta solução indica a presença de ácidos orgânicos.

4.2.5 Pesquisa de fenóis

Foram utilizados 2 mL da solução obtida na pesquisa de ácidos orgânicos adicionando 2 gotas de solução aquosa de cloreto férrico 1%. O desenvolvimento de coloração confirma a presença de fenóis.

4.2.6 Pesquisa de flavonóides

Os flavonóides foram pesquisados pela reação de Shinoda, ou reação de cianidina, com o extrato alcoólico total e com os extratos seletivos. Foram transferidos 5 mL de extrato hidroalcoólico para um tubo de ensaio e posteriormente adicionados 200 mg de limalha de magnésio e 1 mL de ácido clorídrico fumegante pelas paredes do tubo. A formação de cor alaranjada indica presença de flavonóis.

4.2.7 Pesquisa de cumarinas

Foram transferidos para um béquer 30 mL de extrato hidroalcoólico e este foi acidificado até pH 1. A solução foi concentrada em banho-maria a 60°C até 10 mL. Ao resíduo, adicionou-se 5 mL de água deionizada para então realizar a extração em funil de separação com éter etílico em 3 porções de 10 mL.

O volume do extrato orgânico foi reduzido para 5 mL em banho-maria a 60°C. Foram adicionadas 3 gotas do extrato etéreo em 2 pontos de um papel de filtro previamente marcado. Deixou-se secar e então 1 gota de hidróxido de sódio 1N foi adicionada em cada mancha. Uma das manchas foi coberta com uma moeda e o papel foi observado sob luz UV de ondas longas. A fluorescência azul ou verde-amarelada indica reação positiva.

4.2.8 Pesquisa de antraquinonas

Foi levado à fervura 20 mL do extrato alcoólico por 15 minutos sob refluxo, adicionando 3 mL de ácido sulfúrico 10%. Após o resfriamento transferiu-se para um funil de separação junto com 30 mL de água destilada e extraiu-se 3 vezes com 10 mL de tolueno. O extrato toluênico foi concentrado a 10 mL e transferido para um tubo de ensaio. Agitou-se com 10 mL de solução reagente de hidróxido de sódio. O aparecimento de coloração rósea ou avermelhada indica a presença de hidroxiantraquinonas e naftoquinonas.

4.2.9 Pesquisa de esteróis e triterpenos

Foram evaporados 20 mL do extrato alcoólico e extraiu-se com 3 (três) vezes sucessivas de 5 mL de diclorometano. Concentraram-se os extratos obtidos a um volume de 3 mL e foram transferidos para um tubo de ensaio, onde foram adicionados 2 mL de anidrido acético. Cautelosamente, adicionou-se 3 gotas de

ácido sulfúrico. O desenvolvimento de coloração azul passando à verde demonstra a presença de esteróides e /ou triterpenos.

.

4.2.10 Pesquisa de heterosídeos antociânicos

Foram separados 3 porções de 5 mL do extrato aquoso em 3 tubos de ensaio e neutralizados com solução de hidróxido de potássio 5% até obter os pHs 5,5 (pH do extrato aquoso), 7,0 (neutro) e 9,5 (básico). A mudança na coloração das porções neutralizadas indica presença de heterosídeos antociânicos.

4.2.11 Pesquisa de heterosídeos saponínicos

Agitaram-se os 3 tubos obtidos no ensaio de heterosídeos antociânicos energicamente durante 5 minutos. A espuma persistente em um dos tubos indica a presença de saponinas, confirmada pela adição de solução aquosa de ácido clorídrico 1%.

4.2.12 Pesquisa de heterosídeos cianogênicos

Foram transferidos 15 mL do extrato aquoso para um tubo de ensaio, com o cuidado de não umedecer as paredes superiores. Foi adicionado 1 mL de ácido sulfúrico 1N a uma tira de papel picrossódico que ficou preso, com auxílio de uma rolha, dentro do tubo. O tubo de ensaio foi levado ao banho-maria em temperatura de 60°C por 30 minutos. A formação de cor vermelha no papel indica a presença de heterosídeos cianogênicos.

4.2.13 Pesquisa de gomas, taninos e mucilagens

Foram adicionados 5 gotas de solução de acetato básico e acetato neutro de chumbo 10% a 2 porções de 5 mL do extrato aquoso. A formação de precipitado indica presença de gomas, taninos e mucilagens.

4.2.14 Pesquisa de taninos

Adicionou-se a 5 mL de extrato aquoso, 5 gotas de cloreto férrico 1%. Na formação de precipitado escuro, foram transferidos 5 mL do extrato aquoso para um balão de fundo chato de 100 mL e nele acrescentou-se 5 gotas de formaldeído a 37% e 4 mL de ácido clorídrico. Levou-se a mistura para o refluxo por 1 hora. Após seu resfriamento, filtrou-se a solução e lavou-se o material retido com água destilada e álcool. Se no material retido no filtro houver a formação de coloração pela adição de algumas gotas de solução aquosa de hidróxido de potássio 5%, indica a formação de taninos condensados. Se no filtrado, pelo excesso de acetato de sódio e a adição de 10 gotas de cloreto férrico 1%, houver formação de precipitado escuro ou azul, indica a presença de taninos hidrolisáveis.

4.2.15 Pesquisa de aminogrupos

Concentrou-se 10 mL de extrato aquoso à metade, sob temperatura de 50°C. Em um papel de filtro, foram depositadas 5 gotas desse extrato concentrado e, depois de secas, nebulizou-se com solução butanólica de ninhidrina. Aqueceu-se em estufa a 90-100°C por 15 minutos. O aparecimento de cor azul-violácea indica a presença de aminogrupos.

4.2.16 Pesquisa de ácidos voláteis

Acidificou-se 10 mL do extrato aquoso com ácido sulfúrico 1N e ferveu-se em um tubo de ensaio em banho-maria, com papel indicativo de pH para medição da acidez dos vapores. A coloração ácida indica a presença de ácidos voláteis.

4.2.17 Pesquisa de ácidos fixos

Transferiu-se 20 mL de extrato para um balão de destilação juntamente com 2 mL de solução aquosa de hidróxido de sódio 1N. Levou-se o conteúdo ao refluxo por 30 minutos, foi então resfriado, acidificado com ácido sulfúrico 1N e extraído 3 vezes com 10 mL de éter etílico. Os extratos etéreos foram reunidos, filtrados e secos. Aqueceu-se o resíduo durante 10 minutos a 100°C e a pós, adicionou-se 5 mL de solução de hidróxido de amônio 1N, filtrou-se novamente e transferiu-se para um papel de filtro 3 gotas de modo a obter uma mancha de 1 cm de diâmetro. O papel foi seco em estufa a 100°C por 10 minutos e então foi tratado com o Reagente de Nessler. O desenvolvimento de coloração indicou a presença de ácidos fixos.

4.3. ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS

4.3.1 Determinação do teor de voláteis por perda por dessecação e determinação de sólidos totais por resíduo seco

As análises de determinação do teor de voláteis por perda por dessecação da planta fresca e da droga seca, e a determinação de sólidos totais por resíduo seco foram realizadas em Balança Halógena Sartorius, utilizando cerca de 2,0 g das amostras e temperatura de 75 °C até peso constante.

4.3.2 Determinação do teor de cinzas

As análises de determinação do teor de cinzas foram realizadas utilizando uma Mufla marca Quimis, modelo U34L, com a seguinte programação de temperatura: 105 °C por 10 min; sobe até 260 °C, na razão de 40 °C / min e permanece por 20 min; sobe até 650 °C, na razão de 40 °C / min permanecendo neste patamar por 30 min.

As amostras da droga seca, cerca de 3 gramas, foram submetidas à incineração em cadinhos de porcelana.

4.4 PROCEDIMENTOS GERAIS PARA EXTRAÇÃO E ESTUDO QUÍMICO DAS PARTES AÉREAS DA *A. SPATHULATA*

Os solventes empregados na extração do material botânico e no fracionamento do extrato foram em grau para análise (PA) e grau para análise por cromatografia líquida de alta eficiência (grau HPLC).

4.4.1 Fracionamento do extrato

Para obtenção do extrato bruto e frações semipurificadas cerca de 800 g de material vegetal seco foram extraídos com etanol 80% em aparelho de Soxhlet por 15 horas, obtendo-se 1,6 L de extrato hidroalcoólico. O extrato foi concentrado em evaporador rotativo a temperatura de 60 °C até cerca de 20% do seu volume original para redução da concentração alcoólica, obtendo-se 250 mL de extrato bruto (EB). De posse do extrato foi determinada a concentração de sólidos através da análise de resíduo seco em balança halógena.

O extrato bruto foi fracionado por Soxhlet modificado com hexano, diclorometano e acetato de etila, gerando as respectivas frações hexânica (FH),

diclorometânica (FDC), acetato de etila (FAE) e a fração etanol-água (FEA). Essas então foram secas por evaporação dos solventes.

4.4.2 Cromatografia líquida em coluna

O processamento das frações hexânica, clorofórmica, acetato de etila e metanólica foi feito pela redissolução de cada fração concentrada em metanol e incorporada a 6 g de Sílica-gel 60 – Merck[®] – Art. 7734 – com tamanho de partícula 0,063-0,2mm, 70-230 mesh ASTM (cerca de uma vez o seu peso seco) para a formação da pastilha de sílica. Essa pastilha foi submetida à cromatografia líquida em coluna de 30 cm de altura por 3 cm de diâmetro, empacotada com 30 g de Sílica-gel 60 (0,063-0,200mm) Merck[®]. A amostra foi eluída em sistema de solventes com gradiente de polaridade crescente, sendo utilizados hexano, acetato de etila e metanol. Começando com hexano 100 % e adicionando acetato de etila numa razão crescente de 5% até atingir 100 % deste, passando então a adicionar metanol na mesma proporção até chegar a 100 %. Foram coletadas subfrações com cerca de 10 mL cada, resultando em mais de 200 subfrações para cada fração cromatografada. Os solventes das subfrações foram evaporados em temperatura ambiente e as características das subfrações recolhidas foram observadas por cromatografia líquida de alta eficiência. As subfrações semelhantes foram reunidas dissolvendo-as em clorofórmio ou metanol.

Os compostos isolados foram identificados através de técnicas analíticas de espectroscopia de ressonância magnética nuclear de próton e de carbono (RMN de ¹H e ¹³C), espectrometria de infravermelho próximo (NIR), e espectrometria de ultravioleta (UV).

4.4.3 Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

O extrato bruto, as frações FDC e FAE assim como as subfrações obtidas dessas frações tiveram seu perfil analisados por CLAE com Detector DAD.

As análises foram realizadas em um sistema da marca MERCK modelo Elite LaChrom equipado com bomba quaternária modelo L-2130, detector DAD L-2455 e coluna Xterra RP18 250 mm x 4,6 mm e partículas com 5 μ m. Para todas as corridas, a temperatura utilizada foi a ambiente (entre 20 e 25 $^{\circ}$ C). Para os perfis cromatográficos o volume de injeção foi de 20 μ L e o detector foi programado para fazer a varredura de 190 a 450 nm.

4.4.3.1 Perfil cromatográfico do extrato bruto

O gradiente de eluição utilizado para determinar o perfil cromatográfico do extrato bruto, utilizando como fase móvel solução aquosa de ácido fosfórico 0,2 % em ácido sulfúrico 0,01 N e acetonitrila grau HPLC, está descrito na tabela 1. O preparo da amostra foi feito diluindo 100 mg do EB para 50 mL em metanol HPLC. Após a homogeneização, a amostra foi filtrada em membrana de celulose de 0,45 μ m.

TABELA 1: GRADIENTE DE ELUIÇÃO DO MÉTODO DE PERFIL CROMATOGRÁFICO DO EXTRATO BRUTO.

Tempo (min)	Solução ácida (%)	ACN (%)	Fluxo (mL/min)
0	90	10	0,7
25	88	12	0,7
75	63	37	0,7
76	10	90	1,0
82	10	90	1,0
83	90	10	0,7
90	90	10	0,7

4.4.3.2 Perfil cromatográfico das frações DC e FAE e suas frações

Para a determinação do perfil cromatográfico dessas frações utilizou-se como fase móvel solução aquosa de ácido fosfórico 0,2 % em ácido sulfúrico 0,01 N e metanol grau HPLC conforme descrito na tabela abaixo.

TABELA 2: GRADIENTE DE ELUIÇÃO DO MÉTODO DE PERFIL CROMATOGRÁFICO DAS FRAÇÕES DC E FAE.

Tempo (min)	Solução ácida (%)	Metanol (%)	Fluxo (mL / min)
0	90	10	0,8
35	50	50	0,8
36	10	90	1,0
40	10	90	1,0
41	90	10	0,8
45	90	10	0,8

Já para as subfrações obtidas das frações diclorometano e acetato de etila foram utilizadas as mesmas fases móveis, porém com um diferente gradiente de eluição, descrito na tabela abaixo.

TABELA 3: GRADIENTE DE ELUIÇÃO DO MÉTODO DE PERFIL CROMATOGRÁFICO DAS SUBFRAÇÕES OBTIDOS DAS FRAÇÕES DC E AE

Tempo (min)	Solução ácida (%)	Metanol (%)	Fluxo (mL/min)
0	95	5	0,8
30	20	80	0,8
31	5	95	1,0
35	5	95	1,0
36	95	5	0,8
40	95	5	0,8

4.4.4. Isolamento e purificação por CLAE – Semipreparativa

Para a purificação das sub-frações FAE 76 a 80, onde foi identificada a presença de compostos nas maiores concentrações, foi utilizado CLAE com detector de arranjo de diodos e uma coluna Xterra PrepRP18 300 mm x 7,8 mm e partículas com 10 μ m. A temperatura da coluna foi a ambiente e o volume de injeção foi de 100 μ L. Como fase móvel foi utilizada água e metanol grau HPLC no gradiente de eluição descrito na tabela 4. A amostra foi preparada pela dissolução das sub-frações reunidas com 1 mL de metanol grau HPLC. E a coleta foi realizada na saída do detector entre 14 e 16 minutos em cada corrida. Foram realizadas 8 corridas e os eluentes reunidos de cada corrida foram secos por evaporação do solvente em estufa a vácuo a 45 °C e 0,7 atm de pressão.

TABELA 4: GRADIENTE DE ELUIÇÃO DO MÉTODO SEMIPREPARATIVO DE CLAE

Tempo (min)	Água (%)	Metanol (%)	Fluxo (mL / min)
0	90	10	4,5
30	85	15	4,5
45	60	40	4,5
60	20	80	4,5

4.5 ELUCIDAÇÃO ESTRUTURAL

4.5.1 Espectroscopia de absorção no ultravioleta

Os espectros de absorção no ultravioleta foram obtidos nas análises do perfil das frações e compostos isolados por CLAE com detector DAD.

4.5.2 Espectroscopia de absorção em infravermelho

Os espectros de infravermelho foram obtidos colocando as amostras do isolado, previamente dessecado em dessecador por 12 horas, diretamente sobre o diamante do amostrador ATR, em equipamento Spectrum One da Perkin Elmer, no Laboratório Instrumental de O Boticário.

4.5.3 Espectroscopia de ressonância nuclear magnética de ^1H e ^{13}C

Para RMN, foi utilizado o aparelho Bruker Avance 400 (^1H : 400 MHz; ^{13}C : 100 MHz), utilizando como solvente metanol deuterado e como padrão interno o tetrametilsilano (TMS). A análise dos dados obtidos foi realizada com auxílio do programa MestreNova.

4.6 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DO EXTRATO BRUTO E DAS FRAÇÕES

Para avaliação da atividade antimicrobiana foram empregados os métodos da Concentração Mínima Inibitória (CMI), de acordo com Koneman *et al.* (1993). Utilizando-se cepas comerciais dos microorganismos *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Escherichia coli*. Foram testados nestes métodos o extrato bruto (EB), as frações hexânica (HE), diclorometânica (FDC), acetato de etila (FAE) e as substâncias isoladas.

4.6.1 Método da Concentração Mínima Inibitória (CMI)

Foi utilizado o método de diluição em caldo para a determinação da CMI dos extratos e das substâncias isoladas. Para tanto, microorganismos foram inoculados

em meios de cultura contendo as amostras a serem testadas em concentrações crescentes. Realizou-se a leitura dos tubos após tempo necessário para incubação, em temperatura adequada a cada microorganismo. Como controles positivos da inibição do crescimento dos microorganismos, foram utilizados discos contendo gentamicina.

4.6.1.1 Preparo do inóculo

As cepas bacterianas foram repicadas em caldo trípico de soja (Casoy) a 5°C, por 24 horas. Então, a turbidez de 10 mL do caldo foi comparada à produzida pelo 0,5 da escala Mac Farland. Em seguida, diluiu-se 2 mL deste caldo em 100 mL de solução estéril de Tween 80 a 2% em água destilada.

4.7 BIOENSAIOS DE ATIVIDADE ALELOPÁTICA

4.7.1 Bioensaios de germinação e crescimento.

Os efeitos potencialmente alelopáticos dos extratos e frações foram avaliados sobre a germinação e crescimento de alface (*Lactuca sativa* L. cultivar Grand Rapids). Para os bioensaios, solução-estoque na concentração de 1000 mg.L⁻¹ foi preparada a partir da massa calculada para cada extrato e frações, levando-se em consideração o teor de umidade, as quais foram dissolvidas em DMSO (Dimetilsulfóxido) a 0,1% (DAYAN et al., 2000), sendo as concentrações de 500 e 250 mg.L⁻¹ preparadas por diluição. As soluções foram tamponadas com solução de MES (Ácido 2-morfolinoetanossulfônico) 10 mM, e o pH foi ajustado para 6,0 (MACIAS et al., 2000) com solução de KOH 0,1 N, utilizando-se pHmetro. Para o controle foi utilizado um procedimento similar, porém com ausência dos extratos e frações.

Para os bioensaios de germinação, as placas de Petri (9,0 cm de diâmetro) contendo papel filtro Whatman nº. 1,0, previamente autoclavados, receberam 5,0 mL da solução dos tratamentos (Macias et al., 2000), preparadas nas concentrações de 250, 500 e 1000 mg.L⁻¹. Em seguida, semeou-se sobre cada disco de papel filtro 50 diásporos da espécie-alvo (alface), distribuídos aleatoriamente, com quatro repetições para cada solução (Brasil, 1992). As placas de Petri foram levadas a uma câmara de germinação (BOD), com condições de luz (160 W), umidade relativa (\pm 80%) e temperatura constante, (alface, 25 °C com luz interna constante) conforme Brasil (1992). A contagem para avaliar a germinação foi realizada a cada 12 horas conforme as Regras para Análise de Sementes (Brasil, 1992), contabilizando-se como plântulas normais todas que possuíam as estruturas essenciais do embrião, desenvolvidas e com no mínimo 2,0 mm de comprimento de radícula. O experimento foi considerado concluído quando a germinação foi nula por três dias consecutivos.

Para os bioensaios de crescimento, primeiramente as sementes foram pré-germinadas em placas de Petri contendo papel filtro, umedecidas com 5,0 mL de água destilada. Após a germinação, foram selecionadas 80 plântulas (quatro repetições de 20) para cada tratamento, as quais foram transferidas para placas de Petri contendo as soluções de tratamento, utilizando-se procedimento similar ao descrito nos bioensaios de germinação (Macias et al., 2000). Após três dias da protrusão radicular, mediu-se o alongamento da raiz e do hipocótilo / coleótilo (dez plântulas por placa) utilizando papel milimetrado. Em seguida, essas plântulas foram levadas para secar em uma estufa a 60 °C até peso constante para a obtenção da massa seca.

4.7.2 Índice mitótico

Para determinação desse índice, foi empregada a metodologia descrita por Oliveira *et al.* (1996), com algumas modificações. Foram coletados de cada plântula dois centímetros da raiz primária, a partir da extremidade distal, e imersos em fixador de Farmer (3:1, etanol: ácido acético glacial) (Jensen, 1962), durante 2 horas, a 25 °C e, posteriormente, foram transferidos para uma solução de álcool 70% e armazenados a 8 °C. Para determinação do índice mitótico, as pontas de raízes

foram tratadas na seguinte ordem: 1) água destilada por cinco minutos; 2) ácido clorídrico 1 M por 30 min à temperatura ambiente; 3) água destilada por 5 min; e 4) azul de toluidina 2 % por 5 min. As pontas das raízes coradas tiveram o ápice, 2,0 mm iniciais, cortado sobre lâmina de microscópio, colocando-se em seguida a lamínula e pressionando sob esta o papel de filtro, para esmagamento do ápice e retirada do excesso de corante. O material foi observado em microscópio ótico comum, com aumento de 1000x, contando-se o número de células em cada fase da mitose (prófase, metáfase, anáfase e telófase). Para cada tratamento, foram preparadas três lâminas, avaliando-se três campos / lâmina. O índice mitótico foi obtido dividindo-se o número de células em mitose (prófase + metáfase + anáfase + telófase) pelo número total de células (interfase + mitose), multiplicando-se por 100.

4.7.3 Preparo do material vegetal para testes de atividade enzimática

Foram maceradas 2,0 g de material fresco (plântulas submetidas aos EEB e FS) em almofariz com nitrogênio líquido. O pó resultante foi homogeneizado com tampão fosfato de sódio, pH 7,0, 50 mM, contendo EDTA 2 mM e ácido ascórbico 5 mM. O sobrenadante foi recolhido e utilizado como extrato bruto para as dosagens descritas a seguir, sendo o precipitado descartado (MARQUES; XAVIER FILHO, 1991). Os extratos foram acondicionados a -18°C no Laboratório de farmacotécnica da UFPR, até o momento da análise.

4.7.4 Atividade da peroxidase

Foi determinada segundo Pütter (1974). O sistema de reação continha 0,96 mL de tampão fosfato de sódio (0,1 M, pH 7,0), 20 µL de pirogalol 0,1 M como substrato e 20 µL de H₂O₂, 0,1 M. Em seguida adicionou-se 0,1 mL do extrato e foi realizada a leitura da absorbância em 470 nm a cada 5 min por 1 hora. A atividade específica (atividade peroxidásica / µg proteína) foi expressa em unidades de

atividade enzimática (UAE), onde uma unidade corresponde, arbitrariamente, a uma diferença de 0,001 de absorbância / minuto / μg de proteína (Gray *et al.*, 1996).

4.7.5 Atividade da catalase

O ensaio para a determinação da catalase consistiu na adição de 60 μL de H_2O_2 1M em uma mistura de reação contendo 3 mL de tampão fosfato de sódio 50 mM (pH 6,0) e 100 μL do extrato enzimático. O decréscimo do H_2O_2 foi monitorado pela absorbância a 240 nm, em intervalos de 10 segundos por um período de 1 minuto. A diferença de absorbância (ΔA 240 nm), obtida através de regressão linear, foi dividida pelo o coeficiente de extinção molar do H_2O_2 , 39,4 M^{-1} , cm^{-1} (Aebi, 1984). A atividade da CAT foi expressa em μmol de H_2O_2 min^{-1} . g^{-1} MF.

4.7.6 Atividade da polifenoloxidase

A atividade de polifenoloxidase foi determinada de acordo com Duangmal & Apenten (1999), pela mensuração da conversão do catecol em quinona. O substrato utilizado foi composto por catecol 20 mM dissolvido em tampão fosfato de sódio 100 mM (pH 6,8). Para a reação, que ocorreu a 30 $^{\circ}\text{C}$, 900 μL do substrato foram misturados com 100 μL do extrato protéico. As leituras foram feitas a cada 10 s a 420 nm em espectrofotômetro, durante 1 minuto. O diferencial entre a terceira e a quinta leitura foi utilizado para a determinação da atividade. Os resultados foram expressos em unidades de PPO, sendo que uma unidade foi definida como um incremento de absorbância de 0,001 por min de reação por miligrama de proteína total.

4.7.7 Atividade da α -amilase

Para a determinação da alfa-amilase, o extrato foi colocado em banho-maria a 70°C durante 20 minutos, adicionando-se 0,1 mL da amostra por tubo, completando o volume de 1 mL com tampão e 1 mL de solução de amido, permanecendo incubado a 30°C por 5 minutos. Depois, foi adicionado 1 mL de lugol e 9 mL de água e a leitura foi realizada em espectrofotômetro a 620 nm (ASSOCIATION OF OFFICIAL AGRICULTURAL CHEMISTS, 1965). Os resultados foram expressos em μg de amido hidrolisado por minuto e por grama de sementes ($\mu\text{g}/\text{min} \cdot \text{g}$).

4.7.8 Teor de clorofila e respiração

Os teores de clorofila foram obtidos após a maceração das partes aéreas das plântulas em almofariz e extração com DMSO (CAYON *et al.*, 1990, com modificações). As absorbâncias das soluções foram lidas em espectrofotômetro nos comprimentos de onda de 645 e 663 nm e, a partir desses dados, foram calculados os teores de clorofila a, de clorofila b e de clorofila total (ARNON, 1949).

A respiração potencial das células radiculares das plântulas de alface foi estimada por meio da redução do cloridrato de trifetil tetrazólio (TTC) pela atividade de enzimas desidrogenase e do surgimento do formazan. Para a avaliação dessa característica, as raízes foram cortadas a 1 cm a partir da coifa, sendo tomadas as suas massas e, em seguida, transferidas para tubos de ensaio de 17×120 mm, onde foram adicionados 3 mL de cloridrato de trifetil tetrazólio (TTC) 0,6% (p/v) em tampão fosfato 0,05 M (pH 7,0). Os tubos de ensaio foram mantidos sob vácuo em dessecadores por 2 horas, sendo posteriormente transferidos para banho-maria a 30 °C por 15 horas.

Ao final desse tempo, as soluções de TTC foram drenadas dos tubos de ensaio e as raízes lavadas uma vez em água destilada. Os tubos de ensaio contendo as raízes foram novamente transferidos para o banho-maria com água fervente (± 100 °C), sendo então adicionados 7 mL de etanol 95% (v/v). Decorridos 10 min, as soluções etanólicas obtidas foram drenadas para outros tubos de ensaio.

Após o resfriamento à temperatura ambiente, cada solução foi acrescida de 10 mL de etanol 95% (v/v). As absorbâncias dessas soluções etanólicas foram lidas em espectrofotômetro, no comprimento de onda de 530 nm (STEPONKUS; LANPHEAR, 1967).

4.7.9 Análise estatística

Para cada extrato e frações avaliados, o delineamento experimental adotado foi o inteiramente casualizado, envolvendo nove ensaios simples com quatro tratamentos (0, 250, 500 e 1000 mg.L⁻¹) em quatro repetições. A unidade experimental constituiu-se de 50 diásporos para germinação e dez para o crescimento e massa seca. Os dados foram submetidos à análise de variância e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

4.8 ATIVAÇÃO DE NEUTRÓFILOS

4.8.1 Teste do NBT com PMA

A estimulação ou ativação dos neutrófilos com produção de radicais ativos de oxigênio pode ser visualizada por meio do azul *p*-Nitrotetrazólio, conhecido como NBT, o qual é reduzido na presença destes radicais, formando um produto de coloração azul, denominado formazan (ALVES *et al.*, 2010).

Para este ensaio utilizou-se técnica adaptada e modificada de Park (1968), Park e Good (1970), Higashi *et al.* (1976), Levinsky *et al.* (1983) e Abreu *et al.* (2009). As lâminas foram preparadas com soluções aquosas das amostras em teste e secas a temperatura ambiente. Para controle positivo, utiliza-se PMA (forbol 12-miristato 13-acetato) e para controles negativos utiliza-se sangue sem tratamento e sangue tratado com NBT (azul *p*-Nitrotetrazólio).

As lâminas de vidro a serem testadas foram preparadas 48 horas antes do

ensaio, com adição de 50 µL de soluções 2,5 – 5,0 – 10,0 e 15,0 µg/ mL em água destilada, secas a temperatura ambiente em lâminas marcadas previamente com um círculo. Para controle positivo utilizou-se 50 µL de PMA (forbol 12-miristato 13-acetato) diluído 10,0 µg/ mL de água destilada. Para controle negativo utilizaram-se os sangues sem tratamento e o tratado com NBT (azul *p*-Nitrotetrazólio).

Adicionou-se 3 mL de sangue (coletados no dia do ensaio com EDTA) em 36 mL de água destilada. Após a adição do sangue, homogeneizou-se durante 30 segundos. Em seguida, foram adicionadas 12 mL de PBS 4x (salina tamponada com fosfatos, pH 7,2, concentrada 4 vezes) e homogeneizou-se 15 segundos para depois centrifugar por 10 minutos a 2000 rpm. O sobrenadante foi desprezado e ressuspendeu-se, delicadamente, o sedimento em 3 mL de PBS normal. Em um tubo cônico, contendo 3 mL de uma mistura de polissacarídeos neutros hidrofílicos de alta densidade (Ficoll-Hypaque®, densidade 1,076), o sedimento foi adicionado e centrifugado por 25 minutos a 1500 rpm. Retirou-se o sobrenadante, ressuspendeu-se o sedimento em 3 mL de PBS normal e centrifugou-se por 10 minutos a 2000rpm. O sedimento foi ressuspenso em 1 mL de PBS, sendo que a concentração de neutrófilos neste sedimento deve ser superior a 3×10^6 / mL.

A suspensão de células em PBS foi adicionada no centro do círculo e incubada a 37°C, em câmara úmida, por 20 minutos. Após a incubação, as placas foram lavadas 10 vezes com PBS normal e foi adicionado 1 ou 2 gotas de corante NBT (3,2mg/ 1 mL de PBS normal), com exceção da lâmina controle negativo sem NBT, e incubado por 15 minutos, a 37°C, em câmara úmida. As lâminas foram lavadas 3 vezes com PBS normal e secas à temperatura ambiente. Após a secagem, as lâminas foram coradas com safranina por 10 minutos, lavadas 3 vezes com água destilada e secas à temperatura ambiente. As lâminas foram examinadas ao microscópio, e a presença de grânulos azuis no interior de todos os neutrófilos foi considerada ativação.

Para cada amostra a ser testada, o ensaio foi realizado 5 vezes e somente após verificação de ativação positiva em 5 ensaios a amostra foi considerada ativadora de neutrófilos.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 ENSAIO SISTEMÁTICO DE ANÁLISE EM FITOQUÍMICA DAS PARTES AÉREAS DA DROGA FRESCA

Os resultados do ensaio sistemático de análise em fitoquímica podem ser observados abaixo:

TABELA 5 – RESULTADOS DO ENSAIO SISTEMÁTICO DE ANÁLISE EM FITOQUÍMICA DE *Acicarpa spathulata* .

PESQUISA	EXTRATO	EXTRATO	REAÇÃO					
	ALCOÓLICO	AQUOSO	(+)	(-)	(+)	(-)	(+)	(-)
	20%	20%	1		2		3	
ÁCIDOS ORGÂNICOS	X		+		+		+	
ALCALÓIDES	X			-		-		-
FENÓIS	X		++		++		++	
FLAVONÓIDES	X		+		++		++	
CUMARINAS	X			-		-		-
ANTRAQUINONAS	X			-		-		-
ESTERÓIS E TRITERPENOS	X		+++		+++		+++	
HETEROSÍDEOS ANTOCIÂNICOS		X		-		-		-
HETEROSÍDEOS SAPONÍNICOS		X	++		++		++	
HETEROSÍDEOS CIANOGENÍCOS		X		-		-		-
GOMAS, TANINOS E MUCILAGENS		X	+		+		+	
TANINOS		X	++		++		++	
AMINOGRUPOS		X	+		+		+	
ÁCIDOS VOLÁREIS		X		-		-		-
ÁCIDOS FIXOS		X	+		+			-
			+ Resultado Fracamente Positivo					
Observações			- Resultado Negativo					
			++ Resultado Positivo					
			+++ Resultado Fortemente Positivo					

A análise fitoquímica preliminar do extrato alcoólico acusou a presença de esteróides e triterpenos, com resultado fortemente positivo, mostrando que essa espécie possui uma grande quantidade desses compostos, os fenólicos também foram detectados com resultado satisfatório demonstrando que fazem parte da

composição química da *A. spathulata*. Além disso, foi constatada a presença de flavonóides e ácidos orgânicos.

No extrato aquoso os principais compostos presentes são heterosídeos saponínicos e os taninos.

5.2 DETERMINAÇÃO DO TEOR DE VOLÁTEIS

O teor de voláteis, realizado por balança de perda por dessecação com lâmpada halógena, foi igual a $32 \pm 0,5\%$ na planta fresca e após a secagem o teor obtido foi igual a $12 \pm 0,07\%$.

5.3 DETERMINAÇÃO DO TEOR DE CINZAS

O teor de cinzas para a droga seca, determinado conforme metodologia descrita no item 4.3.2 foi igual a $7,23 \pm 0,02\%$. Por se tratar de uma espécie natural de um solo com alta concentração salina, a amostra não apresentou teor de cinzas totais elevados, pois somente para comparação o valor máximo de cinzas totais descrito na monografia da *Malva sylvestris* L. na Farmacopéia Brasileira é igual a 16%.

5.4 RENDIMENTO NA EXTRAÇÃO

O extrato bruto das partes aéreas de *Acicarpha spathulata* ., foi obtido a partir de 800 g de material estabilizado e moído, resultando em 250 mL de extrato bruto. A partir de 200 mL do extrato bruto foram obtidas as frações hexânica, clorofórmica, acetato de etila e a fração aquosa remanescente. O rendimento após evaporação do solvente é mostrado na tabela 6.

TABELA 6 – RENDIMENTO DAS FRAÇÕES EXTRAÍDAS POR SOXHLET: FRAÇÕES EXTRAÍDAS, RENDIMENTO EM GRAMAS E EM PORCENTAGEM EM RELAÇÃO À MASSA DA DROGA SECA

Fração	Rendimento em gramas	Rendimento em % (m/m) em relação à droga seca
Hexânica	7,2	0,90
Diclorometânica	7,7	0,96
Acetato de etila	4,5	0,56
Aquosa remanescente	34,5	4,31
Total	53,9	6,74

5.5 DETERMINAÇÃO DE TEOR DE SÓLIDOS

O teor de sólidos obtido em balança de perda por dessecação por lâmpada halógena para o extrato bruto EB foi de $32 \pm 0,1\%$ (p/p). Este valor demonstrou a eficiência da extração, pois os 250 mL do extrato bruto equivalem a 80 g de sólidos, o que por sua vez equivale a 10 % da massa da planta seca. Da mesma forma se considerado que os 200 mL utilizados no fracionamento equivalem a 64 g de sólidos, e que a soma dos resíduos de todas as frações resultou em 53,9 g (TABELA 6), obteve-se um rendimento de cerca de 84 % no fracionamento.

5.6 ANÁLISES CROMATOGRÁFICAS

Foram realizadas análises cromatográficas por CLAE das frações FAE e DC e também do EB, as quais apresentam uma variedade de substâncias. Os espectros de algumas das substâncias obtidos pelo detector DAD indicam a possível presença de metabólitos secundários como cafeoilquínicos, flavonóides, e terpenos como iridóides e seco-iridóides, o que confirma os dados indicativos apresentados na literatura. A figura 6 mostra o espectro UV entre 200 e 400 nm do perfil cromatográfico do EB, onde se pode notar que nos tempos de 10 a 22 minutos temos as substâncias que apresentam as maiores absorbâncias, acima de 200 mAu

de acordo com a escala utilizada. Quando são comparados dois compostos diferentes, uma maior absorbância não necessariamente indica maior concentração, pois cada substância possui um valor de absortividade molar (ϵ) que é expresso pela absortividade do composto multiplicado pelo peso molecular (SILVERSTEIN, 1994). Porém os compostos com tempo de retenção 12,18 e 21,80 minutos apresentam absorbância pelo menos duas vezes maior que o restante das substâncias que podem ser visualizadas. Pode-se considerar então que essas são as de maior concentração dentre as substâncias do extrato bruto que absorvem nessa região do UV.

A figura 6A apresenta também um composto com RT de 23,69 min que demonstra uma forte área de absorção entre 280 e 350 nm, característico dos cafeoilquínicos como pode ser mais bem visualizado na figura 7. A figura 6B traz o cromatograma extraído em 245 nm, pois é o comprimento de maior absorção desta análise. O composto cafeoilquínico citado não aparece como um pico apesar de sua concentração, pois cafeoilquínicos não têm forte absorção neste comprimento de onda, e não tendo uma boa resolução do composto com maior absorção em 245 nm, aparece como um ombro desse composto. Mais adiante, no espectro de absorção, temos quatro compostos que possuem áreas de absorção entre 220 e 370 nm aproximadamente e outra região entre 320 e 370 nm, característica dos flavonóides e flavonas. Estão marcadas na figura 4 B com RT de 50,64; 54,95; 59,03 e 63,85 minutos.

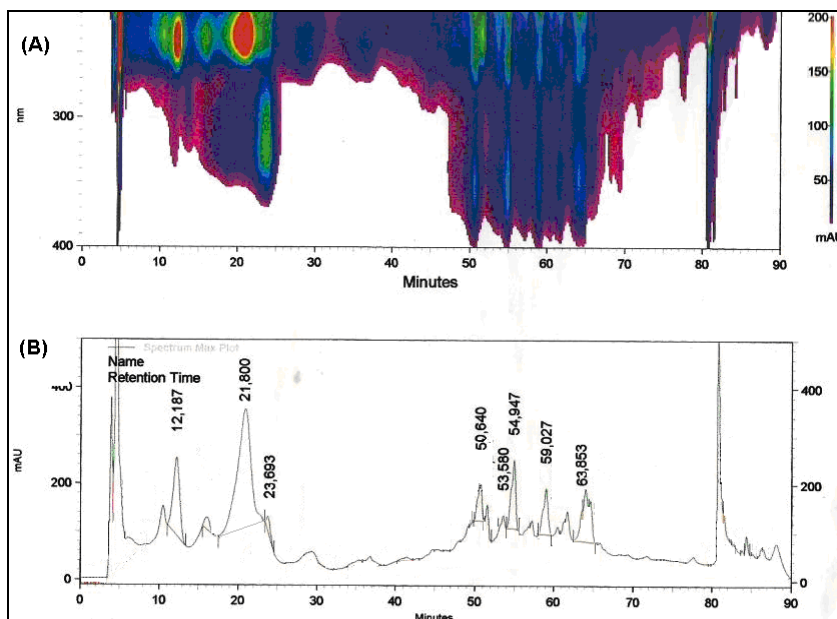


FIGURA 6 – Perfil cromatográfico por CLAE – DAD do extrato bruto de *A. spathulata*. Figura A mostra o espectro de varredura de 220 a 400 nm dos principais constituintes do EB, a figura B mostra o cromatograma do EB em 245 nm.

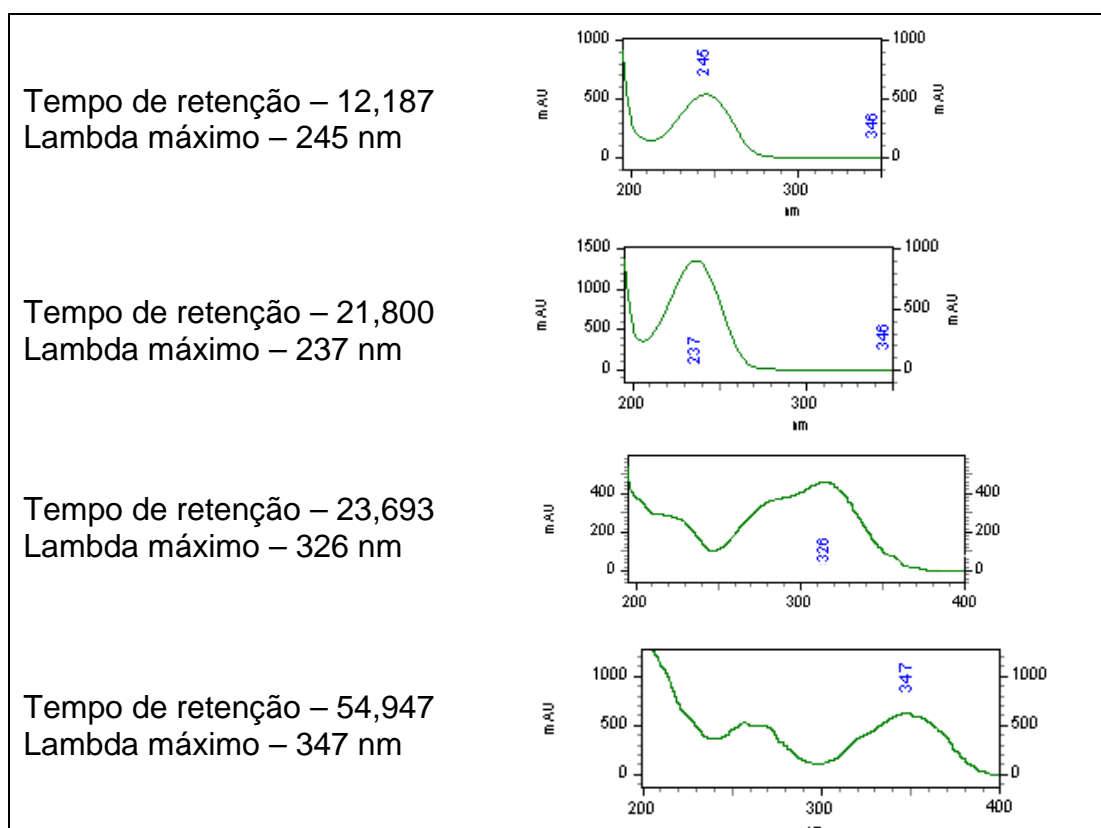


FIGURA 7 – Espectros de absorção no UV dos principais compostos, seus tempos de retenção e valores de comprimentos de onda de absorção máxima.

A figura 7 mostra os espectros dos principais compostos que podem ser visualizados no perfil cromatográfico do extrato bruto. Os compostos com RT de 12,187 e 21,80 possuem absorção máxima em 245 nm e 237 nm respectivamente.

5.6.1 Fração diclorometano

A partir da fração diclorometano, foi realizada a cromatografia líquida em coluna com eluente hexano / acetato de etila, com um gradiente de 5%, e com eluente acetato de etila / metanol igualmente com gradiente de 5%. Foram recolhidas, respectivamente 62 e 57 subfrações de aproximadamente 15 mL cada.

A figura 8 mostra o perfil cromatográfico da fração diclorometano, pode-se notar a presença predominante de um composto com tempo de retenção igual a 14,72 min e comprimento de onda com absorção máxima em 236 nm.

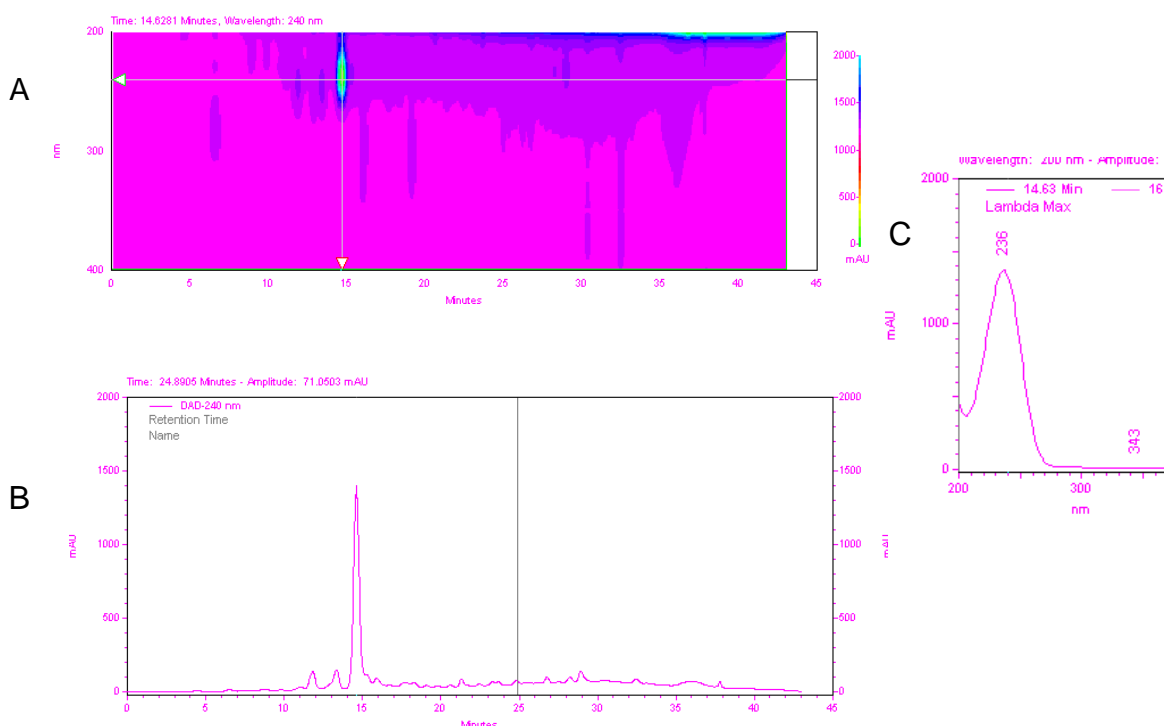


FIGURA 8 – Perfil Cromatográfico da Fração Diclorometano por CLAE-DAD: espectro de absorbância da Fração Diclorometano, perfil cromatográfico e o espectro de absorbância do principal composto da fração.

5.6.2 Fração acetato de etila

A partir da fração acetato de etila, foi realizada a cromatografia líquida em coluna com eluente hexano / acetato de etila com um gradiente de 5%, e com eluente acetato de etila/metanol igualmente com gradiente de 5%. Foram recolhidas 211 sub-frações de aproximadamente 10 mL cada.

Deixou-se evaporar os solventes e foi traçado o perfil cromatográfico da fração antes da partição e de algumas subfrações.

O ácido clorogênico foi identificado por CLAE com detector DAD na fração acetato e sua identidade foi confirmada por adição do padrão preparado a 0,1 mg/mL de ácido clorogênico em metanol HPLC. O cromatograma foi adquirido em 326 nm, conforme demonstrado nas figuras 9 (A) e 9 (B).

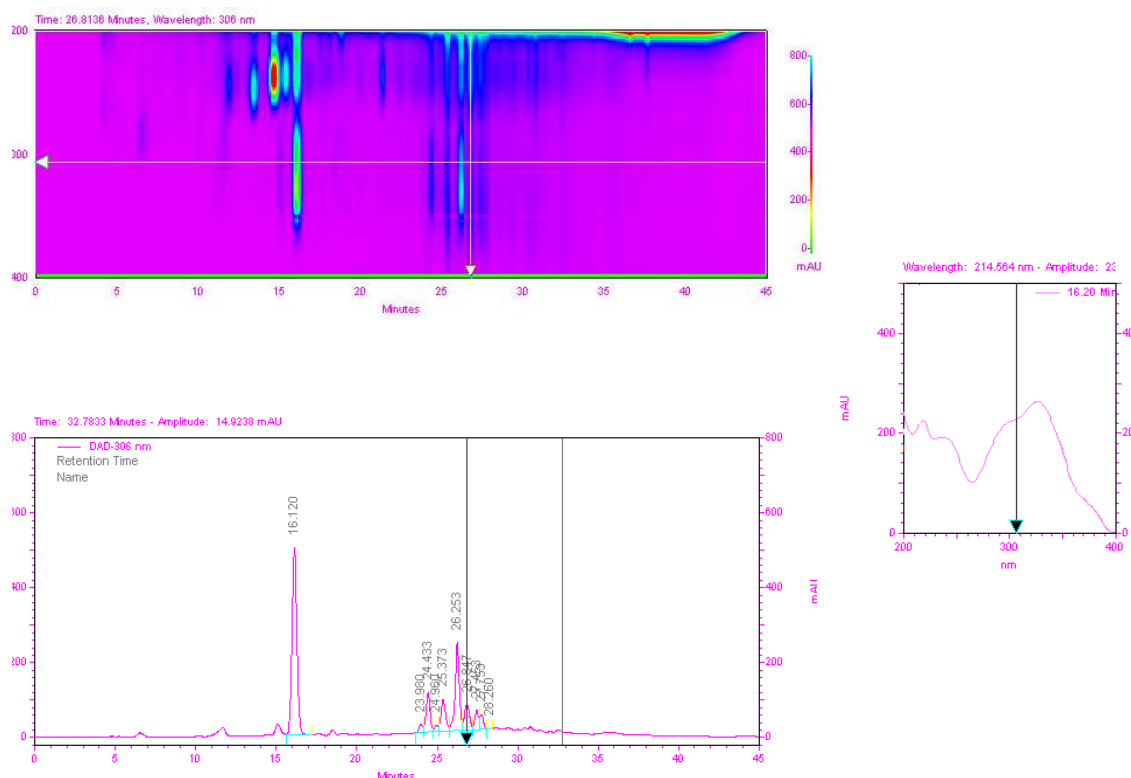


FIGURA 9 (A) – Perfil Cromatográfico da Fração Acetato de Etila

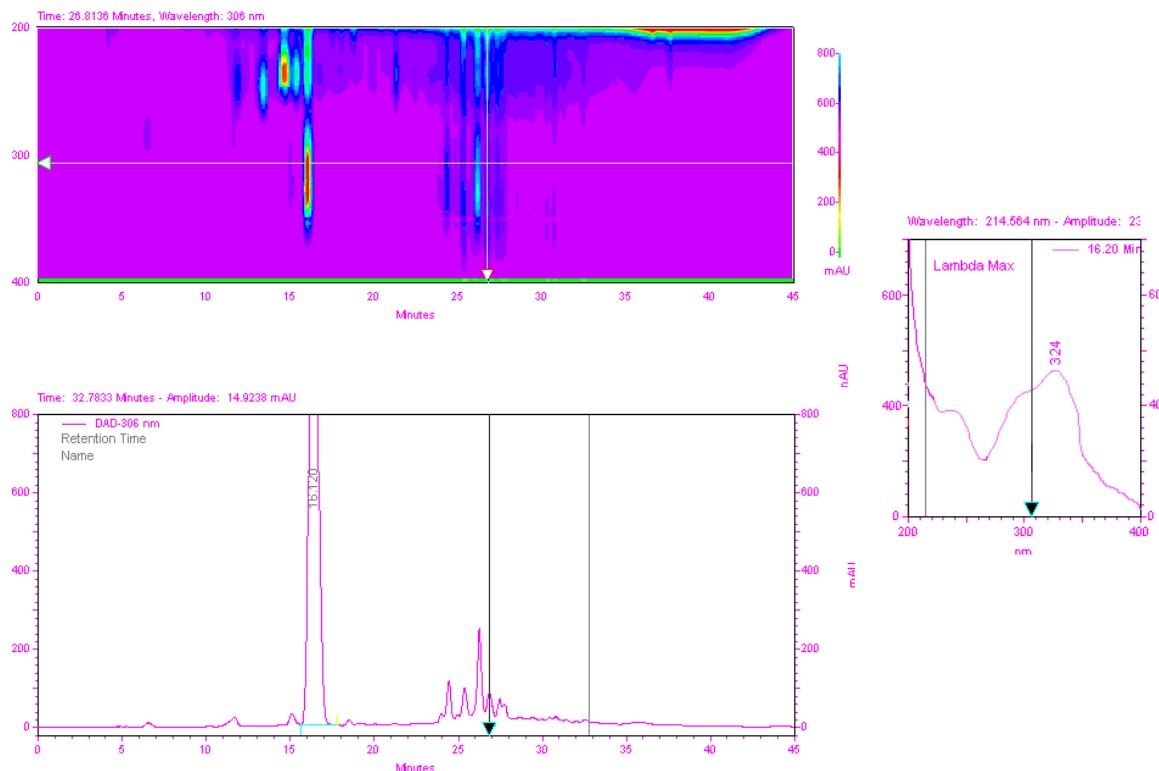


FIGURA 9 (B) –Confirmação da Presença de Ácido Clorogênico por Adição do Padrão a Fração.

Além do ácido clorogênico, pode-se identificar a presença de três compostos com comprimento de onda de absorção máximo de 245, 234 e 236 nm, que pode ser característico de iridóides ou seco-iridóides, além de outros cafeoilquínicos e flavonóides em pequenas concentrações. Nota-se também, que o composto com absorção máxima em 234 nm possui tempo de retenção e comprimento de onda de máxima absorção igual ao principal composto da fração diclorometano e do composto isolado da fração acetato de etila, tratando-se provavelmente do mesmo composto, o qual demonstra ser o mais abundante na planta.

As subfrações 76 a 88 apresentaram, após a evaporação do solvente, um líquido viscoso amarelo. O perfil cromatográfico das subfrações foi determinado e essas foram divididas em dois grupos, conforme a semelhança da composição. No primeiro grupo, subfrações 76 a 80 foi detectada a presença de um composto

predominante com tempo de retenção de 14,33 min e comprimento de absorção máxima de 236 nm, como mostra a figura 10.

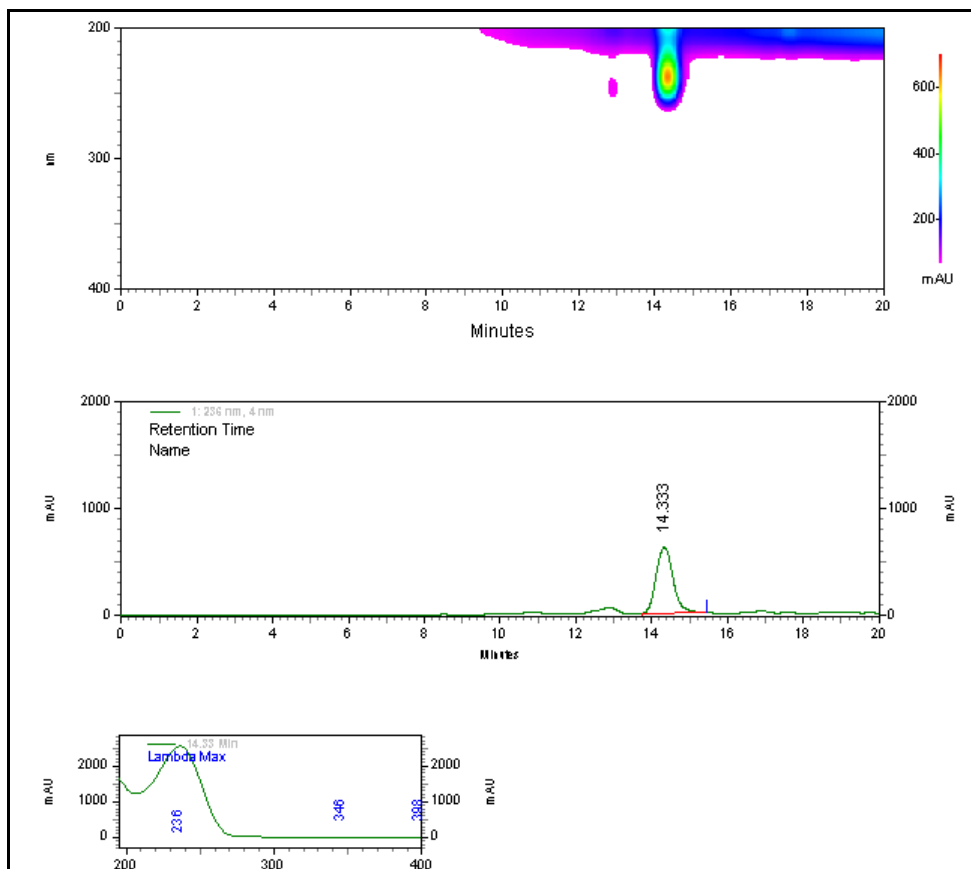
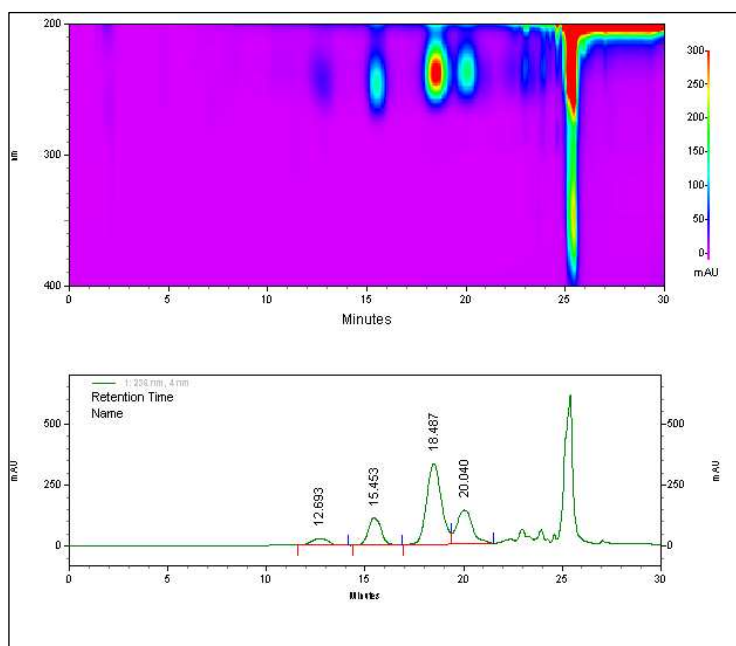


FIGURA 10 – Perfil Cromatográfico das Subfrações 76 A 80 Reunidas

As subfrações 81 a 88 foram reunidas em outro grupo que apresentou composição semelhante entre si. A análise do perfil cromatográfico revelou tratar-se de uma mistura de quatro compostos com comprimento de onda de absorção máximo de 241, 245, 237 e 236 nm, conforme mostra figura 11, sendo o de maior concentração o composto isolado no outro grupo.

A



B

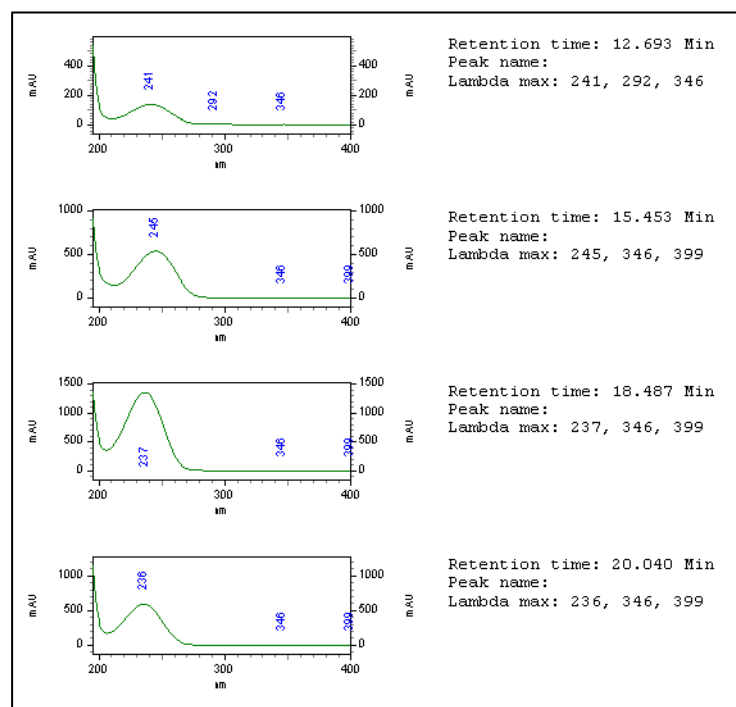
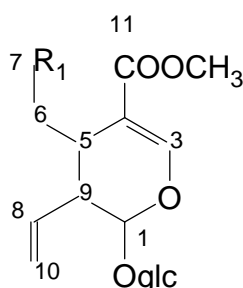


FIGURA 11 – Perfil Cromatográfico das Subfrações 81 A 88 Reunidas (A), Espectro de Absorção no UV dos Quatro Principais Compostos (B)

5.7 ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DAS SUBFRAÇÕES ACETATO DE ETILA REUNIDAS 76 A 80

A partir das subfrações acetato de etila de 76 a 80 foi obtida uma mistura de compostos **IR1** e **IR2** na forma de um líquido viscoso amarelo. Os compostos da mistura apresentaram absorção máxima no UV em 234. A análise de RMN ^{13}C em 100 MHz, utilizando como solvente metanol deuterado, resultou nos valores descritos na tabela 7, os quais, comparados com a literatura, indicam possivelmente tratar-se da mistura de secologanina com seu derivado alcoólico secologanol (Figura 12).



$\text{R}_1 = \text{CHO}$ SECOLOGANINA

$\text{R}_1 = \text{CH}_2\text{OH}$ SECOLOGANOL

FIGURA 12: Fórmulas estruturais da secologanina e do secologanol

Em um trabalho visando estabelecer a rota biossintética da secologanina, Contin e colaboradores (1998), afirmam que os sinais obtidos para o grupamento glicosil na espectroscopia de RMN ^{13}C são mais intensos que para a porção iridoídica, pois, segundo os autores, isso se deve ao fato desse seco-iridóide possuir um aldeído que pode sofrer enolização reversível ou hidratação reversível quando em soluções aquosas. Portanto, existem diversas formas interconvertíveis da secologanina numa solução, e é por esse motivo que o espectro apresenta diferentes sinais para os carbonos da aglicona e todos dividem os mesmos sinais do açúcar.

TABELA 7: VALORES ENCONTRADOS NA ANÁLISE RMN ^{13}C 200 MHZ PARA AS SUBFRAÇÕES ACETATO DE ETILA 76 A 80 E VALORES DA LITERATURA PARA O SECOLOGANOL E A SECOLOGANINA.

C	IR1	Secologanol*	IR2	Secologanina**
Aglicona				
1	97,8	97,8	98,22	97,74
3	153,36	153,5	153,80	153,94
4	111,9	111,8	111,9	109,52
5	29,75	30,9	29,50	27,46
6	37,43	33,6	37,53	44,53
7	64,3	61,3	203,4	207,6
8	135,7	135,8	134,6	133,59
9	45,25	45,4	45,25	44,51
10	119,8	119,5	119,8	121,51
11	169,33	169,5	169,40	170,20
OMe	51,8	51,7	51,8	52,52
Açúcar				
1'	100,08	100,3	100,08	99,48
2'	74,6	74,7	74,6	73,27
3'	77,98	78,0	77,98	76,32
4'	71,52	71,6	71,52	70,24
5'	78,35	78,4	78,35	77,04
6'	62,73	62,8	62,73	61,37

*GARCIA, MPONDO MPONDO *et al.*, 1989

**CONTIN *et al.*, 1998

Segundo Garcia, Mpondo e Mpondo (1989), os espectros de ^1H e de ^{13}C do secologanol indicam a presença de dois hidrogênios em 3,55 ppm, correspondente ao H7 e seu carbono correspondente em 61,3 ppm (C-7), e também próton em 1,88 ppm (H-6) correspondente ao C-6 com sinal em 33,6 ppm. Esses carbonos são encontrados no DEPT como sendo CH₂. Da mesma forma se pode ver, para a mistura de compostos isolados, um sinal forte em 3,60 para o secologanol no espectro de ^1H (Figura 13), que corresponde com o C7 com sinal 64,1 ppm no espectro de ^{13}C (Figura 14), que também é confirmado pelo DEPT obtido na análise da amostra (Figura 15) como sendo um CH₂. Da mesma forma, o DEPT mostra um sinal de CH₂ para o C6 com valor de 36,11 ppm. Todos os outros valores encontrados para o secologanol são confirmados pelos valores encontrados por Garcia, Mpondo e Mpondo (1989).

Os valores espectrais encontrados para os carbonos da secologanina, por Contin e colaboradores (1989), correspondem com os sinais encontrados na análise dos compostos IR1 e IR2, com destaque para o sinal em 203,4 ppm correspondente ao carbono da carbonila, confirmado no DEPT como sendo CH. Estes valores são confirmados por El Naggat e Beal em seu artigo de revisão sobre iridóides publicado em 1980, onde também aparece o nome Lonicerosídeo como sinônimo para secologanina.

Dinda e colaboradores (2009), nos dados descritos para o seco-iridóide glicosilado 6'-O-b-Glucopiranosilsecologanol, confirmam os valores já descritos para o secologanol, citando 62,2 ppm como o valor de C-7.

A análise do DEPT (Figura 15), "Distortionless Enhancement by Polarization Transfer" ou Intensificação do Sinal sem Distorção por Transferência de Polarização, mostra como sendo CH₂ os carbonos com absorção em 36,11; 61,31; 62,89; e 118,38 ppm, que correspondem com os carbonos C-6, C-6', C-7 e C-10, correspondendo com estes nas estruturas propostas. O valor de 45,08 ppm do C-6 da secologanina não aparece no DEPT como CH₂ provavelmente devido à proximidade com o sinal dos carbonos terciários C-9 (45,08) presentes nas duas estruturas e que possuem maior intensidade, como pode ser visto na figura 14. Não há sinais em nenhum valor próximo a 110,0 ppm relativo ao C-4, confirmando que se trata de um carbono quaternário.

Os sinais de ¹H RMN descritos por Mpondo e colaboradores (1989), para o composto secologanol são encontrados no espectro mostrado na figura 13 e podem ser comparados na tabela 8. Os valores em torno de 9,67 ppm encontrados no espectro de ¹H correspondem ao H-7 do aldeído no secologanol.

TABELA 8: VALORES ENCONTRADOS NA ANÁLISE RMN ^1H 100 MHZ PARA AS SUBFRAÇÕES ACETATO DE ETILA 76 A 80 E VALORES DA LITERATURA PARA O SECOLOGANOL

	IR 1	Secologanol *
H - 1	5,51	5,52
H - 3	7,43	7,43
H - 5	2,95	2,85
H - 6 A		1,88
H - 6 B		1,69
H - 7	3,6	3,55
H - 8	5,77	5,77
H - 9	2,63	2,63
H - 10 A	5,28	5,28
H - 10 B	5,23	5,23
OAC	3,69	3,68
H - 1'	4,69	4,62
H - 2' -6'	3,29 - 3,87	3,20 - 3,89

*MPONDO MPONDO *et al.*,1989

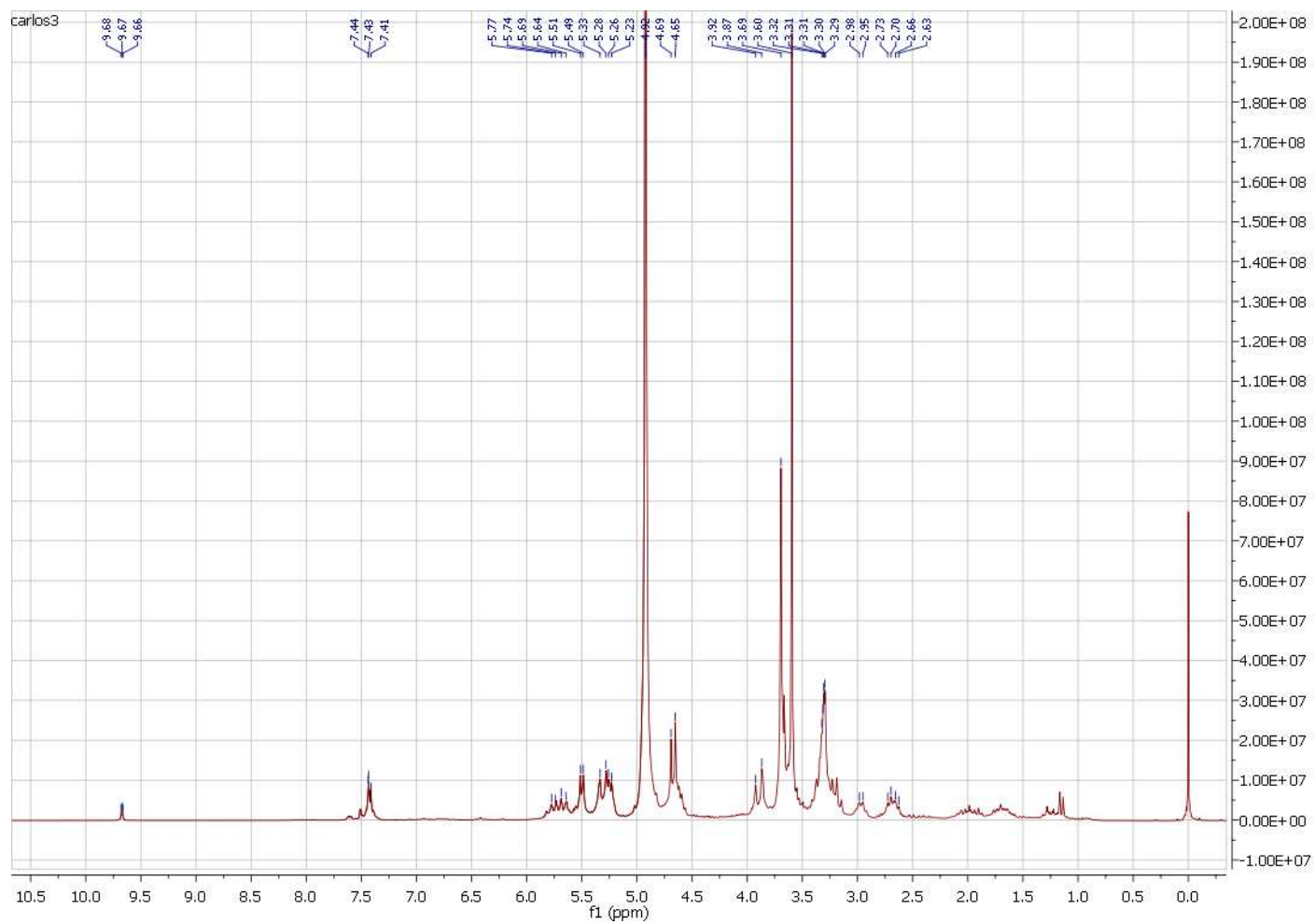


FIGURA 13 – Espectro de ^1H RMN 100 MHz das subfrações reunidas 76 a 80, purificadas por CLAE semipreparativa, diluídas em metanol deuterado com tetrametilsilano como referência (0,0 ppm)

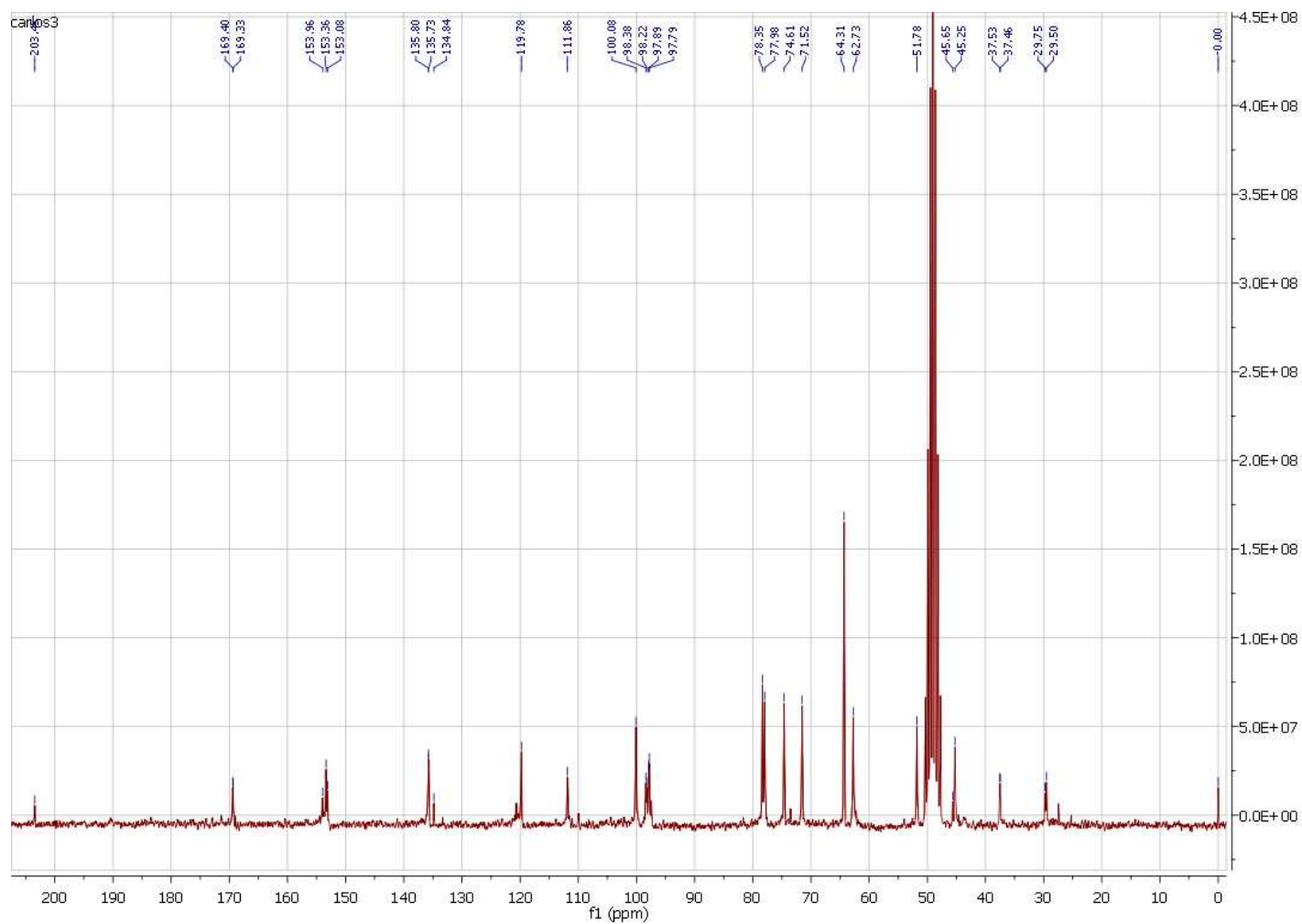


FIGURA 14 – Espectro de ^{13}C H RMN 100 MHz das subfrações reunidas 76 a 80, purificadas por CLAE semipreparativa, diluídas em metanol deuterado com tetrametilsilano como referência (0,0 ppm)

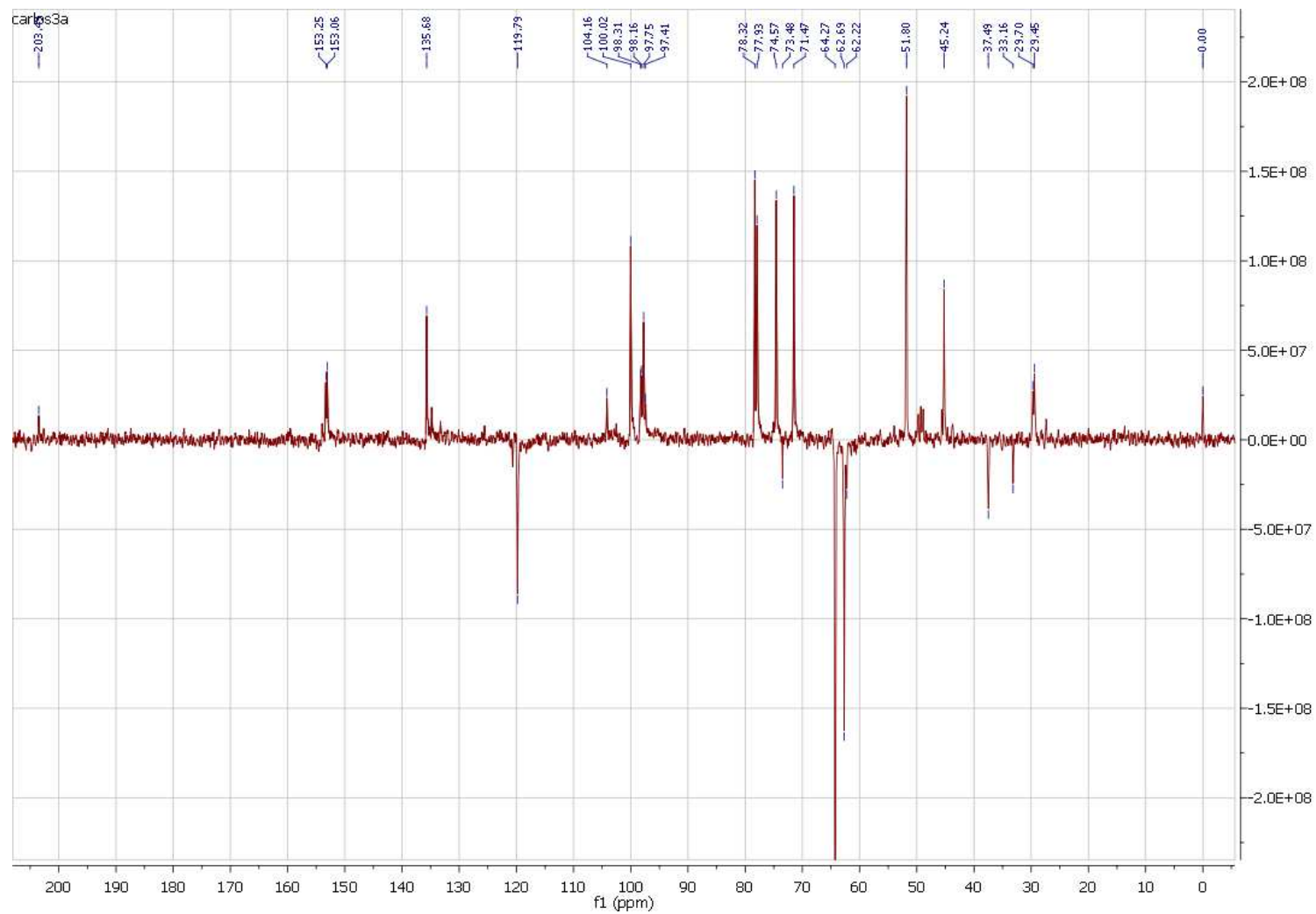


FIGURA 15 – DEPT das subfrações reunidas 76 a 80, purificadas por CLAE semipreparativa, diluídas em metanol deuterado com tetrametilsilano como referência (0,0 ppm)

5.7.1 Resultado IR

O espectro da mistura dos compostos IR1 e IR2 no infravermelho mostra bandas características de O–H em 3364,41 e característica de ligação C–O de alcoóis primários em 1028,75 do secologanol e características da ligação C=O do aldeído em 1691,26 da secologanina, o valor de 1287,27 pode ser da ligação C–C(=O)–O do éster dos dois compostos com a banda correspondendo à vibração simétrica em 1,070 (Figura 16) (SILVERSTEIN, 1994).

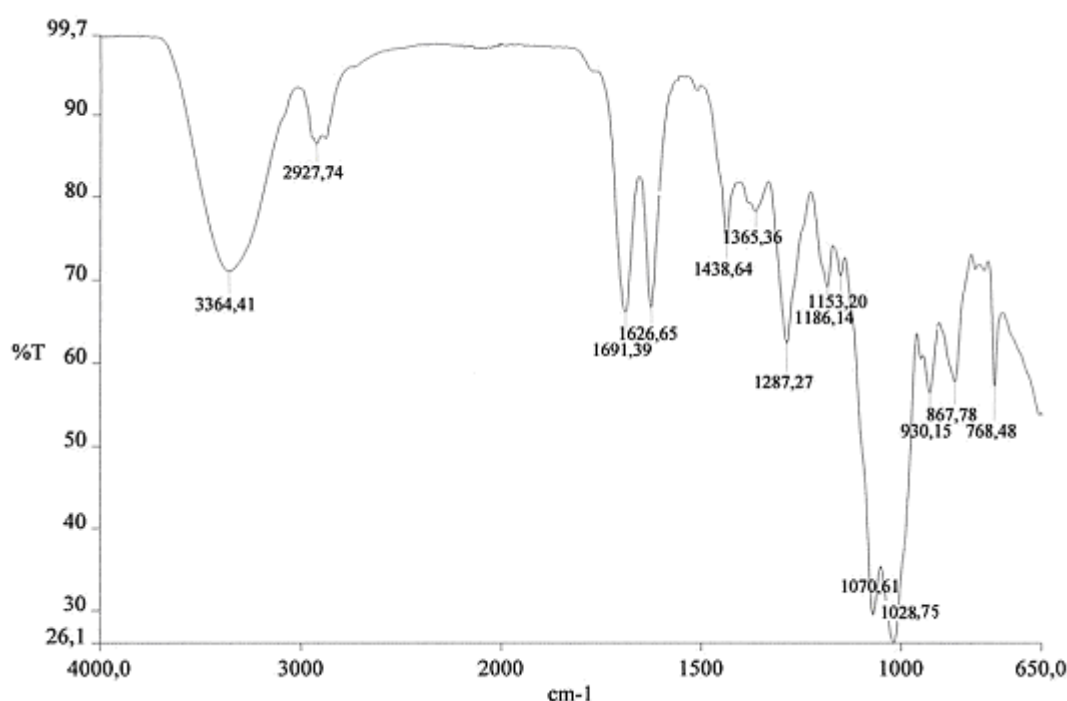


Figura 16 – Espectro infravermelho da mistura de compostos isolados da FAE.

5.8. RESULTADO ATIVAÇÃO DE NEUTRÓFILOS

Para cada amostra a ser testada, o ensaio foi realizado cinco vezes e somente após verificação de ativação positiva em cinco ensaios a amostra foi considerada ativadora de neutrófilos. As concentrações da mistura de compostos IR1 e IR2 demonstraram capacidade de ativação de neutrófilos comparável ao controle positivo PMA. (figuras 17 a 22.)

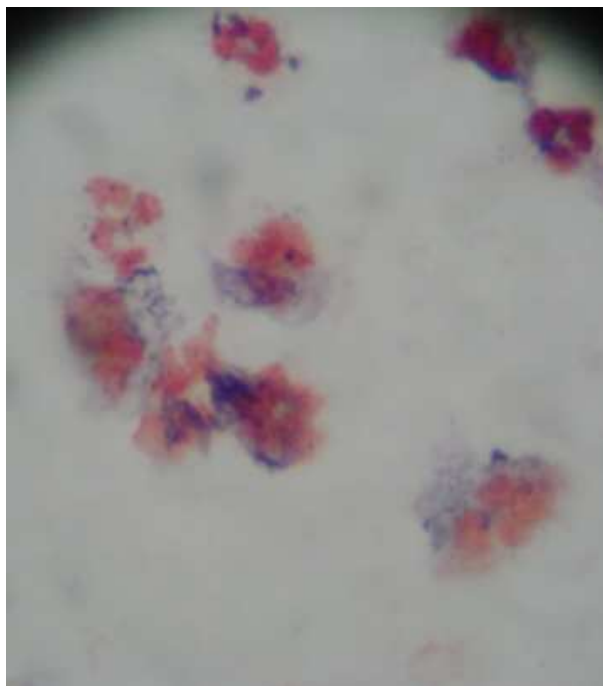


FIGURA 17 – Fotomicroscopia da lâmina de controle positivo com 10 µg/mL de PMA. Fotografia: Josiane Dias

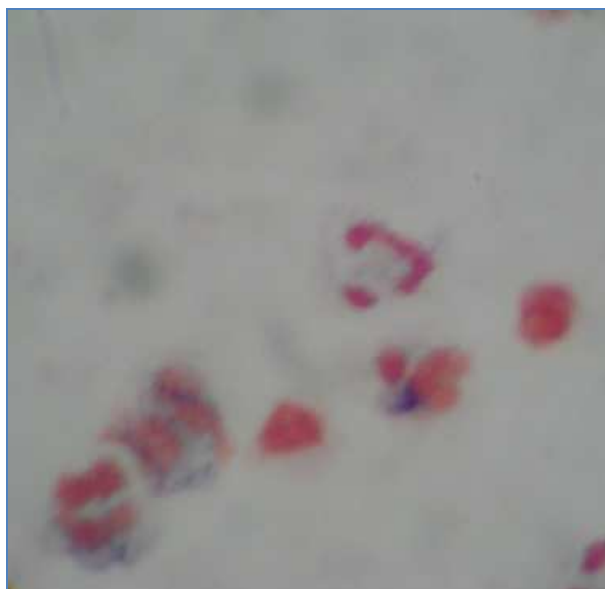


FIGURA 18 – Fotomicroscopia da lâmina de solução de neutrófilos incubados com solução amostra 2,5 µg/mL mostrando grânulos azuis de formazan, indicando ativação dos neutrófilos. Fotografia: Josiane Dias

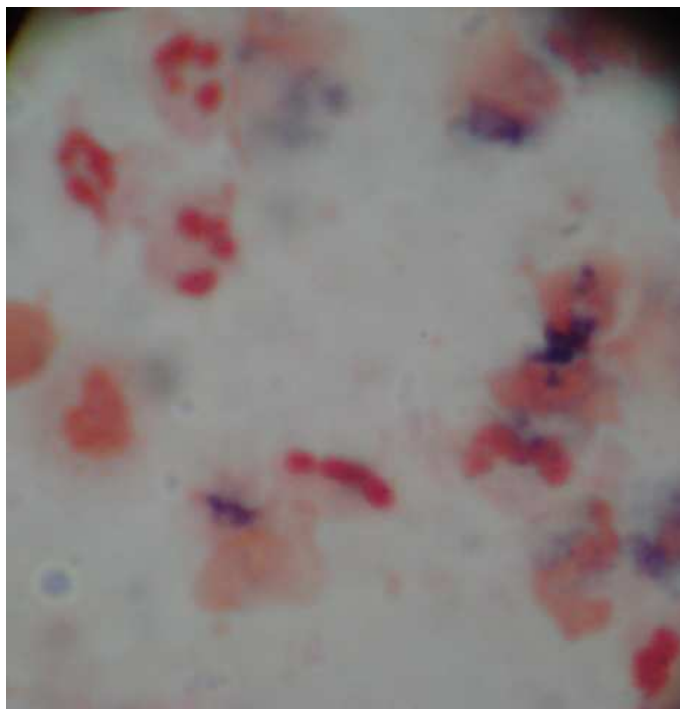


FIGURA 19 – Fotomicroscopia da lâmina de solução de neutrófilos incubados com solução amostra 5 µg/mL mostrando grânulos azuis de formazan, indicando ativação dos neutrófilos. Fotografia: Josiane Dias

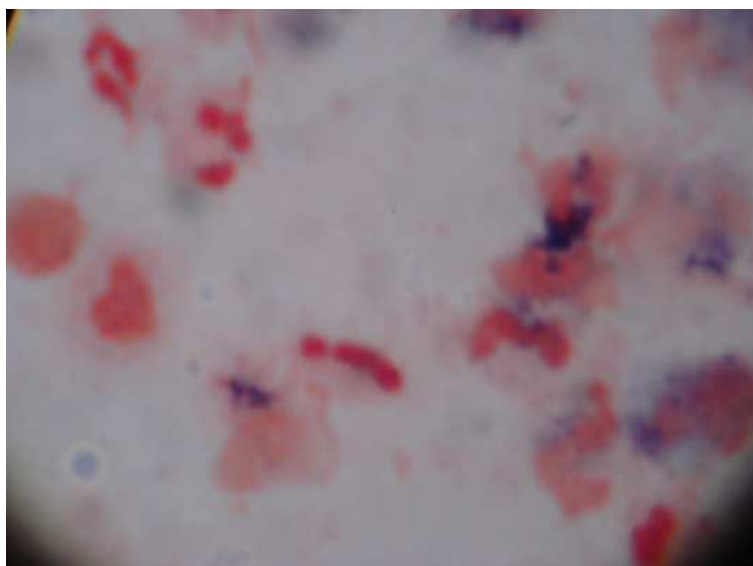


FIGURA 20 – Fotomicroscopia da lâmina de solução de neutrófilos incubados com solução amostra 10 µg/mL mostrando grânulos azuis de formazan, indicando ativação dos neutrófilos. Fotografia: Josiane Dias

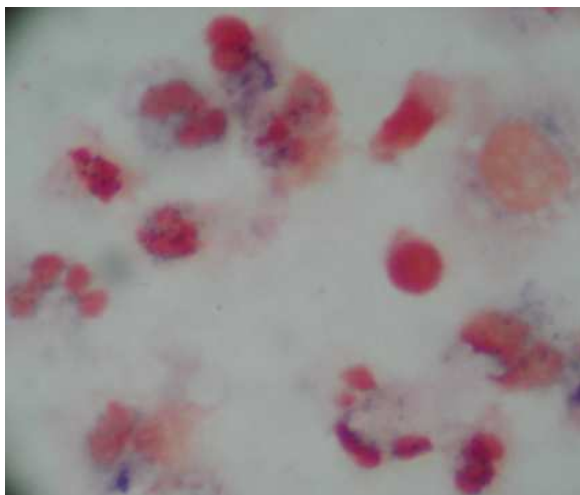
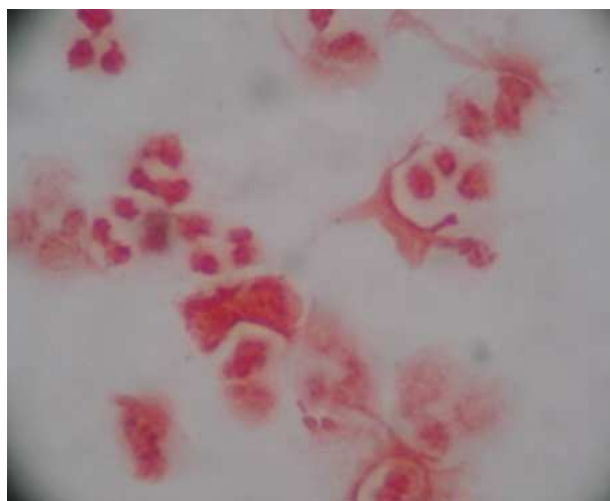
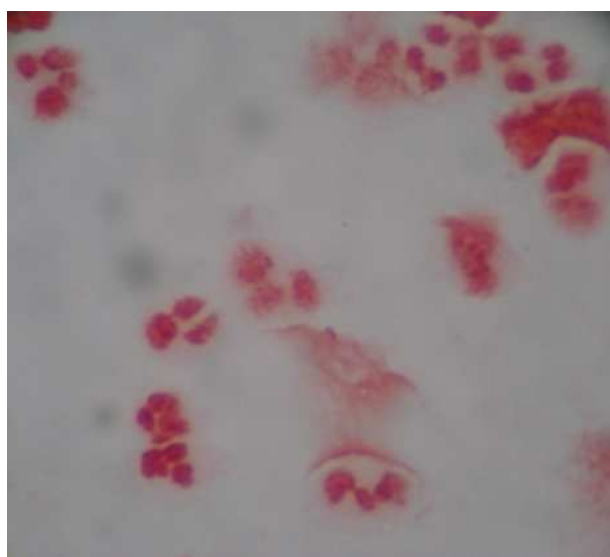


FIGURA 21 – Fotomicroscopia da lâmina de solução de neutrófilos incubados com solução amostra 15 µg/mL mostrando grânulos azuis de formazan, indicando ativação dos neutrófilos. Fotografia: Josiane Dias



(A)



(B)

FIGURA 22 – Fotomicroscopia da lâmina do controle negativo sem tratamento (A), e somente com NBT (B), mostrando que não há a formação de grânulos azuis. Fotografia: Josiane Dias

5.9 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

A atividade antimicrobiana foi determinada para cada uma das três frações, FEA, FAE, DC e FH da *A. spathulata*. A fração etanol-água não apresentou inibição do crescimento de nenhuma das cepas de micro-organismos testados. As frações acetato de etila e diclorometano apresentaram inibição do crescimento microbiano de *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* até a concentração de 1:16. Já a fração hexano demonstrou atividade antimicrobiana, inibindo o crescimento de *Pseudomonas aeruginosa* até a concentração de 1:64, menor concentração testada.

5.10 ATIVIDADE ALELOPÁTICA

5.10.1 Bioensaios de germinação e crescimento

A análise dos efeitos alelopáticos das frações de *Acicarpa spathulata* indicaram que a intensidade dos efeitos variou em função das frações avaliadas e das concentrações utilizadas como indicadores. Nos resultados da velocidade de germinação, foi verificado que todas as frações atrasaram a velocidade de germinação em alface, sendo que acetato de etila e diclorometano causaram reduções superiores a 50% em todas as concentrações ensaiadas. As maiores reduções foram verificadas para as concentrações de 500 mg.L⁻¹ e 1000 mg.L⁻¹, com ± 53 e $\pm 56\%$ para a fração acetato de etila e ± 60 e $\pm 77\%$ para a fração diclorometano (tabela 1).

A germinação foi reduzida em todas as frações avaliadas. A FH e FDCL causaram efeito mais pronunciado de ± 62 e $\pm 74\%$, para a concentração de 1000 mg.L⁻¹ quando comparadas às demais (tabela 1).

Segundo Maguire (1962), o IVG é usado para avaliar o vigor das sementes, pois seu enfraquecimento causa perda progressiva na capacidade

produtiva, com a redução na uniformidade da germinação (PIÑA-RODRIGUEZ *et al.*, 2004).

O vigor é reconhecido como um parâmetro para a caracterização do potencial fisiológico das sementes, indicando a maior ou menor probabilidade de sucesso após a semeadura (MARCOS-FILHO, 2005). Os testes mais simples para a determinação de vigor das sementes são os de velocidade de desenvolvimento, cujos resultados podem ser obtidos pela análise do processo de germinação, mais especificamente pelo IVG.

Com relação ao crescimento, foi verificado que todas as frações causaram reduções significativas nas maiores concentrações ensaiadas (Figura 23). No crescimento da raiz primária e hipocótilo todas as frações e concentrações ensaiadas causaram interferência no crescimento. Os efeitos mais evidentes foram observados na FAE e FDCL, com ± 49 e $\pm 61\%$; ± 64 e $\pm 72\%$ para raiz primária (Gráfico 1) e ± 21 e 35% , 46 e 65% para o hipocótilo (Gráfico 2), nas concentrações de 500 mg.L^{-1} e 1000 mg.L^{-1} , quando comparados ao controle. No teor de massa seca, foi observado que as reduções mais acentuadas também foram ocasionadas pelas FAE e FDCL, com reduções de ± 11 e $\pm 28\%$; ± 12 e $\pm 30\%$, nas concentrações de 500 mg.L^{-1} e 1000 mg.L^{-1} , respectivamente (Gráfico 4).

Em trabalhos realizados com alcalóides glicolisados ALVES *et al.* (2003), observaram que os mesmos provocaram uma redução significativa na porcentagem de plântulas normais a partir da menor concentração testada, e que estes efeitos inibitórios foram revelados através da visível redução do comprimento da raiz, que foi proporcional ao aumento da concentração avaliada.

TABELA 9. ÍNDICE DE VELOCIDADE DE GERMINAÇÃO (IVG) E PORCENTAGEM DE GERMINAÇÃO (G%) DE ALFACE SUBMETIDAS A DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DAS FRAÇÕES HEXÂNICA (FH), DICLOROMETANO (FCL), ACETATO DE ETILA (FAE) E FRAÇÃO ETANOL-ÁGUA (FEA) de *Acicarpa spathulata*.

Tratamento	250 mg.L ⁻¹	500mg.L ⁻¹	1.000mg.L ⁻¹
Controle: 24,88 ± (0,25)			
FH	20,5 ± (0,18) *	18,8 ± (0,97) *	11,4 ± (0,74) *
FAE	11,9 ± 0,76) *	11,5 ± (1,40) *	10,8 ± (2,51) *
FDC	12,21 ± (0,37) *	9,84 ± (1,05) *	5,54 ± (0,70) *
FEA	18,9 ± (0,70) *	19,0 ± (0,61) *	15,7 ± (0,77) *
Porcentagem de germinação (% G)			
Tratamento	250 mg.L ⁻¹	500 mg.L ⁻¹	1.000mg.L ⁻¹
Controle: 99,5 (1,00)			
FH	86,5 ± (1,91) *	82,5 ± (1,00) *	72,0 ± (1,63) *
FAE	85,0 ± (1,15) *	81,0 ± (1,15) *	79,0 ± (1,15) *
FDC	79,0 ± (1,15) *	71,0 ± (1,15) *	64,5 ± (1,15) *
FEA	84,5 ± (1,00) *	80,5 ± (1,00) *	75,0 ± (1,15) *

*A média do tratamento difere significativamente ($p < 0,05$) em comparação com a média do controle, pelo teste de Tukey.

A literatura reporta que aleloquímicos induzem o aumento da atividade de enzimas oxidativas, tendo como consequência final a modificação da permeabilidade das membranas e a formação de lignina, que contribuem para a redução do alongamento radicular (BAZIRAMAKENGA *et al.*, 1995; FERRARESE *et al.*, 2000).

Nas alterações morfológicas, foi verificado que as frações acetato de etila e diclorometano, que tiveram efeitos mais acentuados, causaram redução de pelos na zona pilífera, o que pode ter causado menor absorção de água e nutrientes pela plântula (figura 24).

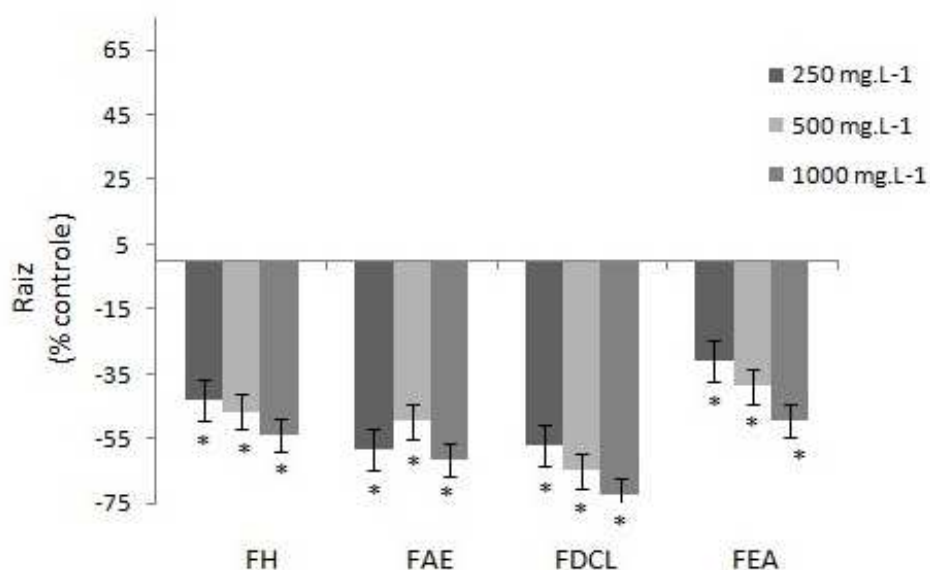


GRÁFICO 1 - COMPRIMENTO DA RAIZ DE ALFACE EM FUNÇÃO DAS CONCENTRAÇÕES DAS FRAÇÕES HEXÂNICA (FH), FRAÇÃO ACETATO DE ETILA (FAE), FRAÇÃO DICLOROMETANO (FDCL) E FRAÇÃO ETANOL-ÁGUA (FEA) DE *A. SPATHULATA*. DADOS EXPRESSOS EM PERCENTUAL EM RELAÇÃO AO CONTROLE.

*A média do tratamento difere significativamente ($p < 0,05$) em comparação com a média do controle, pelo teste de tukey.

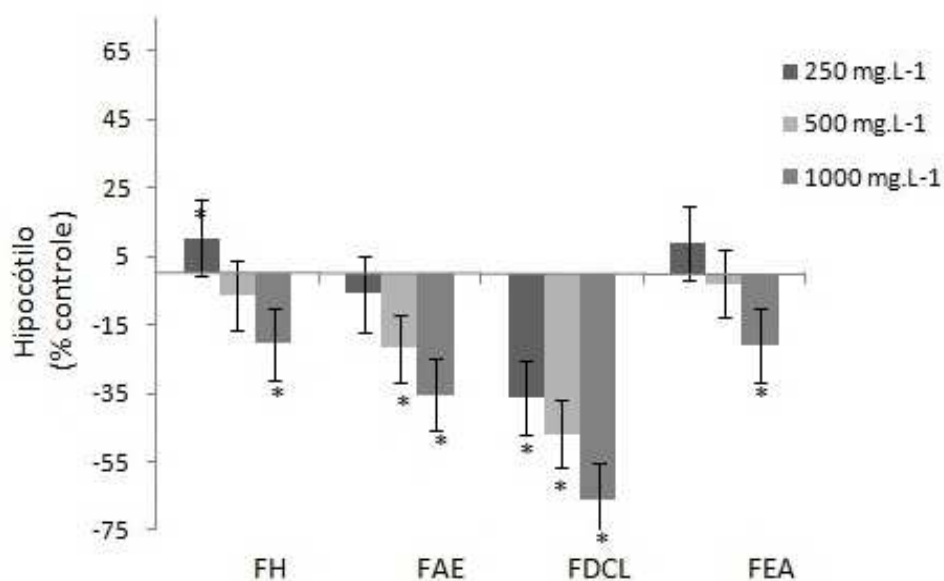


GRÁFICO 2 - COMPRIMENTO DO HIPOCÓTILO DE ALFACE EM FUNÇÃO DAS CONCENTRAÇÕES DAS FRAÇÕES FH, FAE, DCL E FEA. DADOS EXPRESSOS EM PERCENTUAL EM RELAÇÃO AO CONTROLE.

*A média do tratamento difere significativamente ($p < 0,05$) em comparação com a média do controle, pelo teste de tukey

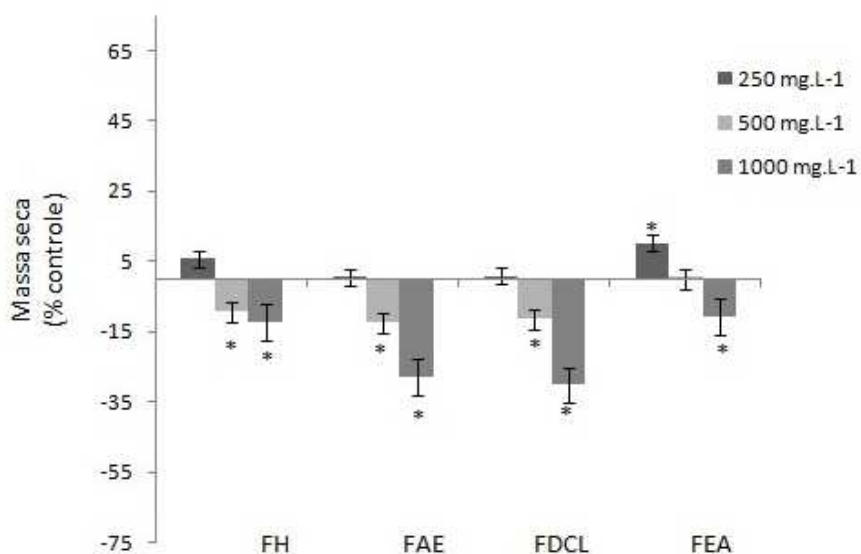


GRÁFICO 3 – ACUMULO DE MASSA SECA DE ALFACE EM FUNÇÃO DAS CONCENTRAÇÕES DAS FRAÇÕES HEXÂNICA (FH), FRAÇÃO ACETATO DE ETILA (FAE), FRAÇÃO DICLOROMETANO (FDCL) E FRAÇÃO ETANOL-ÁGUA (FEA) DE *A. SPATHULATA*. DADOS EXPRESSOS EM PERCENTUAL EM RELAÇÃO AO CONTROLE.

*A média do tratamento difere significativamente ($p < 0,05$) em comparação com a média do controle, pelo teste de tukey



FIGURA 23 – Morfologia do hipocótilo de alface sob ação das diferentes frações de *A. spathulata* Foto: Cristiane Bezerra da Silva

5.10.2 Índice mitótico

No Parâmetro divisão celular, foi observado que, com o aumento da concentração das frações, o valor do índice mitótico foi continuamente reduzido, sendo o maior efeito depressivo verificado na concentração de 1000 mg.L^{-1} , para as frações acetato de etila e diclorometano, em que o índice mitótico atingiu valores próximos a 100%, quando comparado ao controle (Gráfico 4). Comparando-se as frequências das diferentes fases da mitose dentro de cada tratamento, observou-se uma maior frequência de células em prófase (Gráfico 5) e menor frequência das outras fases subsequentes. Em todas as fases da mitose houve uma redução do número total de células encontradas em determinada fase principalmente quanto submetidas a tratamento com as frações FAE e DIC (Gráficos 5, 6, 7 e 8).

Com o aumento das concentrações, houve uma drástica redução no índice mitótico, com paralisação do crescimento radicular a partir da dose de 500 mg.L^{-1} , em consequência principalmente da ausência de telófase (Gráfico 8).

A redução do crescimento de plantas na presença de aleloquímicos é associada com uma forte inibição da mitose ou / e rompimento da estrutura das organelas, como por exemplo, núcleo e mitocôndrias (ALMEIDA *et al.*, 2008).

Essa interferência na divisão celular, causada pela ação das frações, com acentuado efeito sobre a morfologia do sistema radicular, como diminuição de pelos e escurecimento do ápice (Figura 24), provavelmente representa um dos mecanismos de ação das frações sobre o desenvolvimento da espécie-alvo.

A literatura relata que muitas fitotoxinas são capazes de afetar a morfologia e a anatomia de plântulas, o que pode ser evidenciado pelo endurecimento e escurecimento de ápices radiculares, fragilidade e aumento de ramificações (PELLISSIER, 1993; INDERJIT, 1996; CRUZ-ORTEGA *et al.*, 1998).

A redução no tamanho da radícula e hipocótilo (Figura 23 e 24) também pode ser atribuída à presença dos seco-iridóides encontrados na FAE e FDCL, sendo que estes também podem ser responsáveis pela redução do índice

mitótico em raízes de alface, bloqueando completamente a fase de telófase nas maiores concentrações.

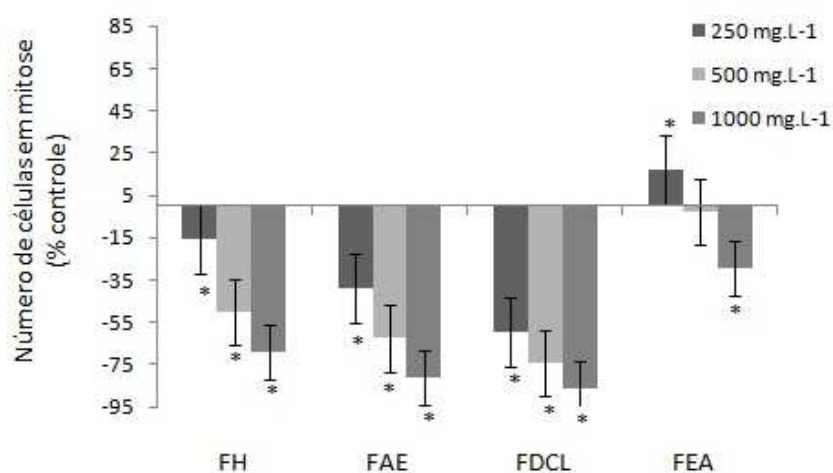


GRÁFICO 4. - PERCENTUAL DE CÉLULAS MERISTEMÁTICAS DE RAÍZES DE PLÂNTULAS DE ALFACE EM MITOSE, DESENVOLVIDAS SOB DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DAS FRAÇÕES HEXÂNICA (FH), FRAÇÃO ACETATO DE ETILA (FAE), FRAÇÃO DICLOROMETANO (FDCL) E FRAÇÃO ETANOL-ÁGUA (FEA) . DADOS EXPRESSOS EM PERCENTUAL EM RELAÇÃO AO CONTROLE. *A média do tratamento difere significativamente ($p < 0,05$) em comparação com a média do controle, pelo teste de Tukey.

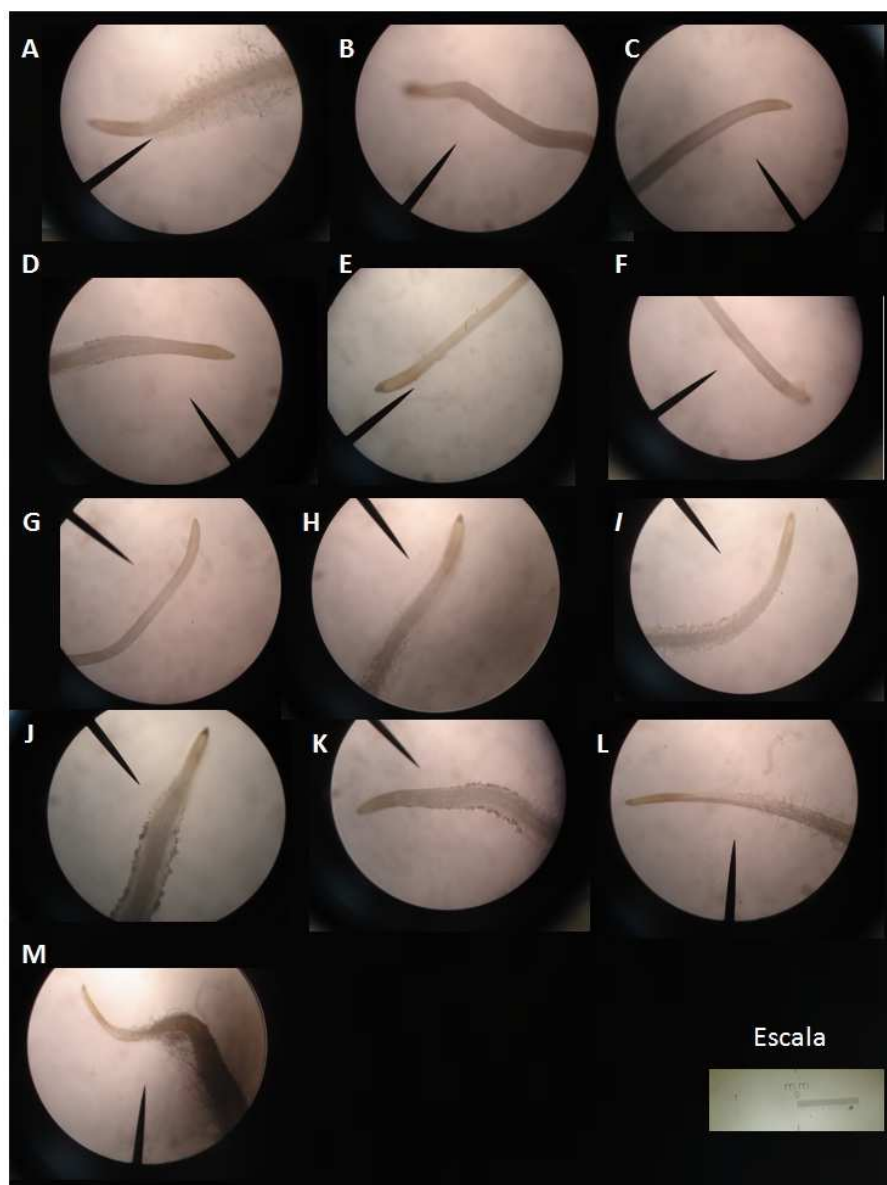


FIGURA 24 – Morfologia da região apical e pilífera de alfaca (A-controle), fração acetato de etila: B- 1.000mg.L^{-1} , C- 500mg.L^{-1} , D- 250mg.L^{-1} , fração diclorometano: E- 1.000mg.L^{-1} , F- 500mg.L^{-1} , G- 250mg.L^{-1} , fração hexânica: H- 1.000mg.L^{-1} , I- 500mg.L^{-1} , J- 250mg.L^{-1} , fração etanol-água: K- 1.000mg.L^{-1} , L- 500mg.L^{-1} , M- 250mg.L^{-1} . Foto: Cristiane Bezerra da Silva

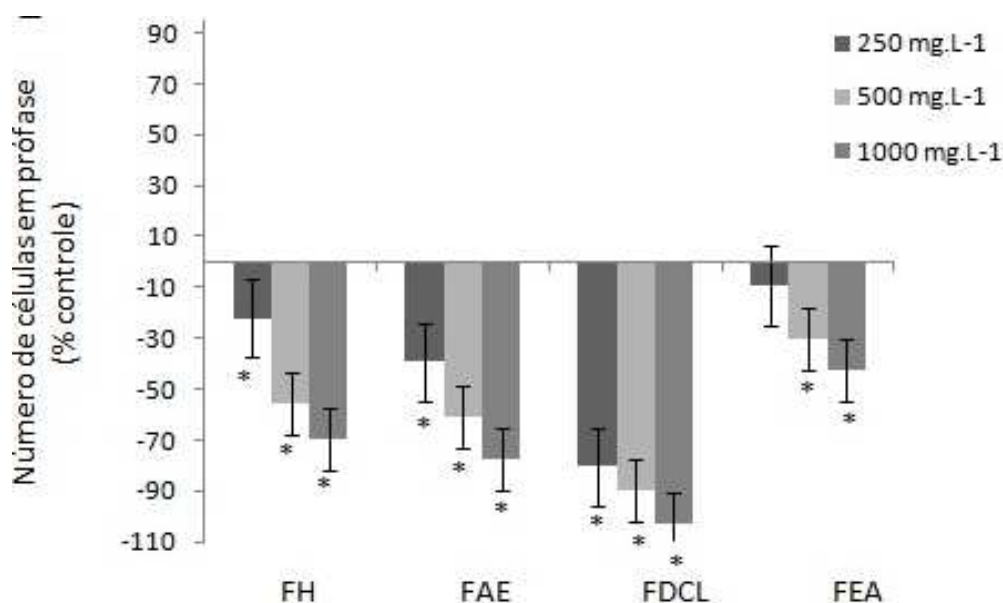


GRÁFICO 5. - PERCENTUAL DE CÉLULAS EM PRÓFASE SOB DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DAS FRAÇÕES HEXÂNICA (FH), FRAÇÃO ACETATO DE ETILA (FAE), FRAÇÃO DICLOROMETANO (FDCL) E FRAÇÃO ETANOL-ÁGUA (FEA) . DADOS EXPRESSOS EM PERCENTUAL EM RELAÇÃO AO CONTROLE. *A média do tratamento difere significativamente ($p < 0,05$) em comparação com a média do controle, pelo teste de Tukey.

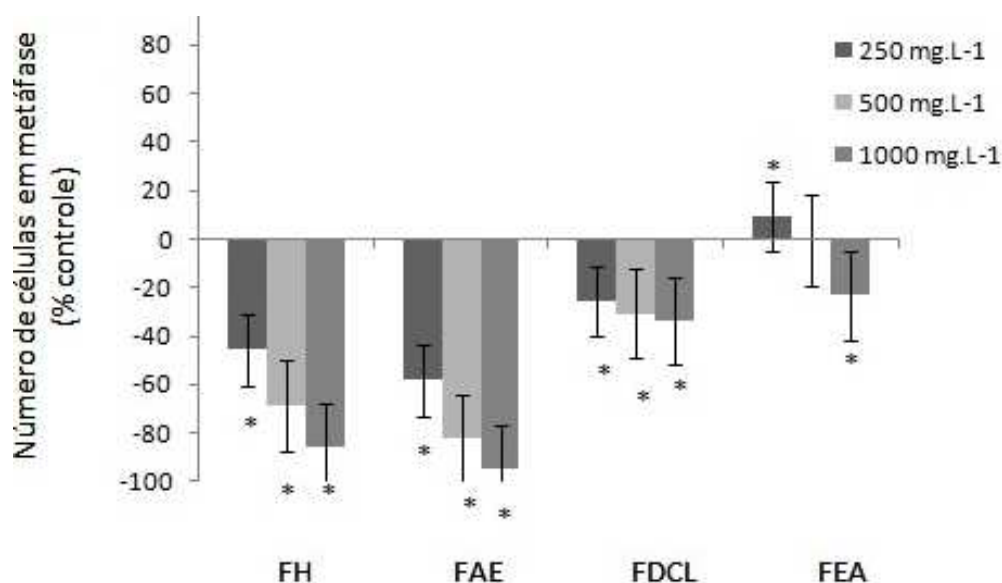


GRÁFICO 6. - PERCENTUAL DE CÉLULAS EM METÁFASE SOB DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DAS FRAÇÕES HEXÂNICA (FH), FRAÇÃO ACETATO DE ETILA (FAE), FRAÇÃO DICLOROMETANO (FDCL) E FRAÇÃO ETANOL-ÁGUA (FEA) . DADOS EXPRESSOS EM PERCENTUAL EM RELAÇÃO AO CONTROLE. *A média do tratamento difere significativamente ($p < 0,05$) em comparação com a média do controle, pelo teste de Tukey.

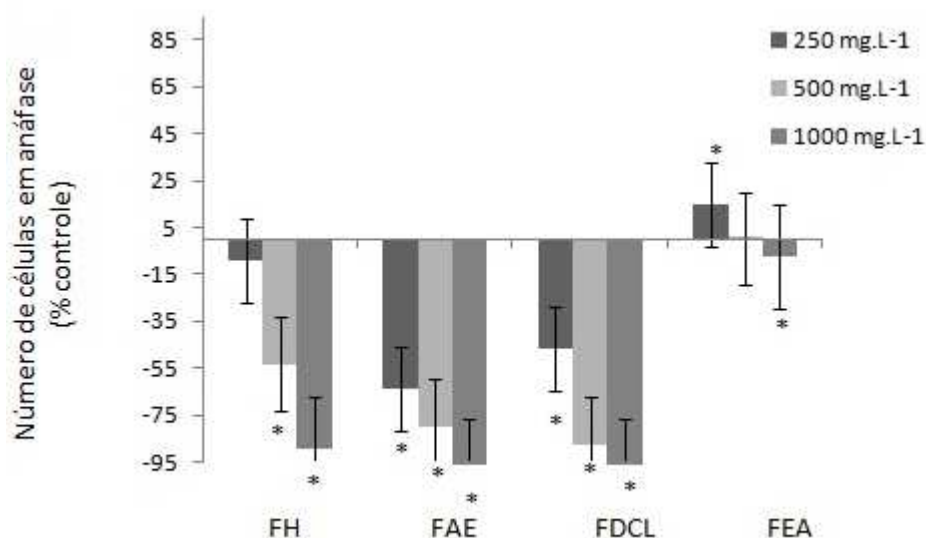


GRÁFICO 7. – PERCENTUAL DE CÉLULAS EM ANÁFASE SOB DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DAS FRAÇÕES HEXÂNICA (FH), FRAÇÃO ACETATO DE ETILA (FAE), FRAÇÃO DICLOROMETANO (FDCL) E FRAÇÃO ETANOL-ÁGUA (FEA). DADOS EXPRESSOS EM PERCENTUAL EM RELAÇÃO AO CONTROLE. *A média do tratamento difere significativamente ($p < 0,05$) em comparação com a média do controle, pelo teste de Tukey.

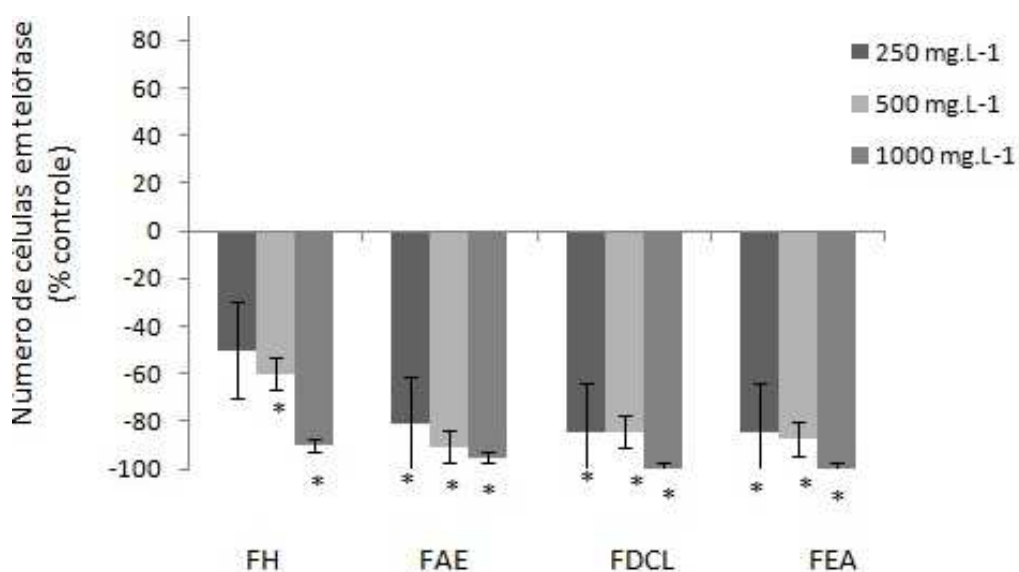


GRÁFICO 8. - PERCENTUAL DE CÉLULAS EM TELÓFASE SOB DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DAS FRAÇÕES HEXÂNICA (FH), FRAÇÃO ACETATO DE ETILA (FAE), FRAÇÃO DICLOROMETANO (FDCL) E FRAÇÃO ETANOL-ÁGUA (FEA). DADOS EXPRESSOS EM PERCENTUAL EM RELAÇÃO AO CONTROLE. *A média do tratamento difere significativamente ($p < 0,05$) em comparação com a média do controle, pelo teste de Tukey

5.10.3 Atividade enzimática

A atividade das enzimas peroxidase (Gráfico 9) e catalase (Gráfico 10) foram acentuadas em todas as concentrações das frações utilizadas, tendo um aumento da atividade enzimática nas concentrações mais elevadas. No entanto, as plântulas de alface foram mais sensíveis às frações acetato de etila e diclorometano, nas maiores concentrações ensaiadas, sugerindo uma possível relação de causa e efeito. A atividade da polifenoloxidase foi alta apenas para as frações acetato de etila e diclorometano, sendo que as demais frações não causaram aumento na produção da mesma.

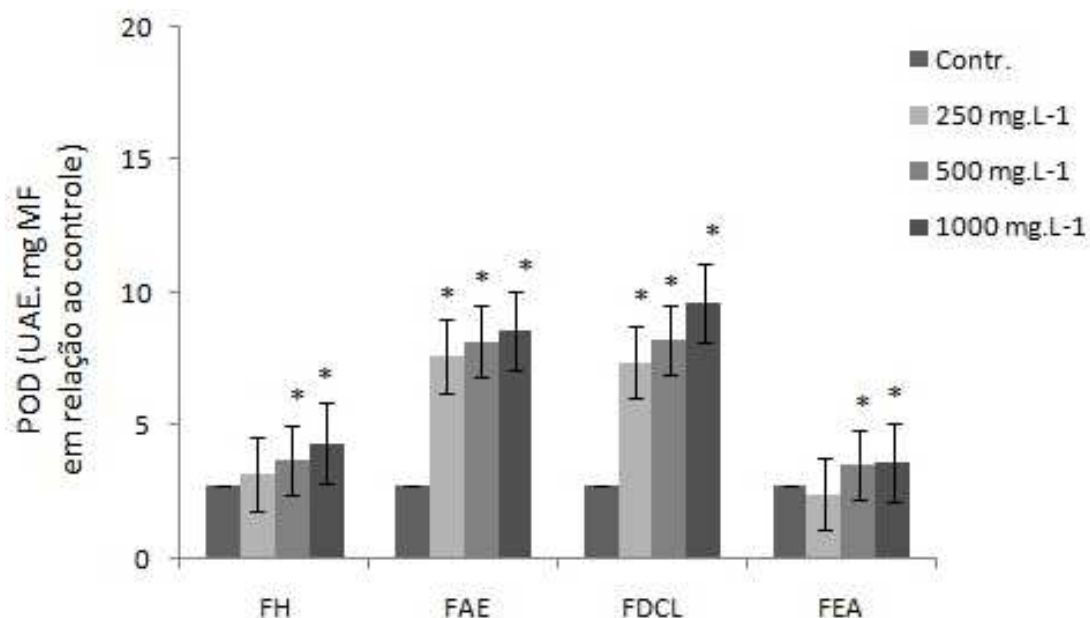


GRÁFICO 9 – ATIVIDADE DA PEROXIDASE EM FUNÇÃO DAS CONCENTRAÇÕES DAS FRAÇÕES HEXÂNICA (FH), FRAÇÃO ACETATO DE ETILA (FAE), FRAÇÃO DICLOROMETANO (FDCL) E FRAÇÃO ETANOL-ÁGUA (FEA) DE *A. SPATHULATA* EM *LACTUCA SATIVA*. DADOS EXPRESSOS EM PERCENTUAL EM RELAÇÃO AO CONTROLE. *A média do tratamento difere significativamente ($p < 0,05$) em comparação com a média do controle, pelo teste de Tukey.

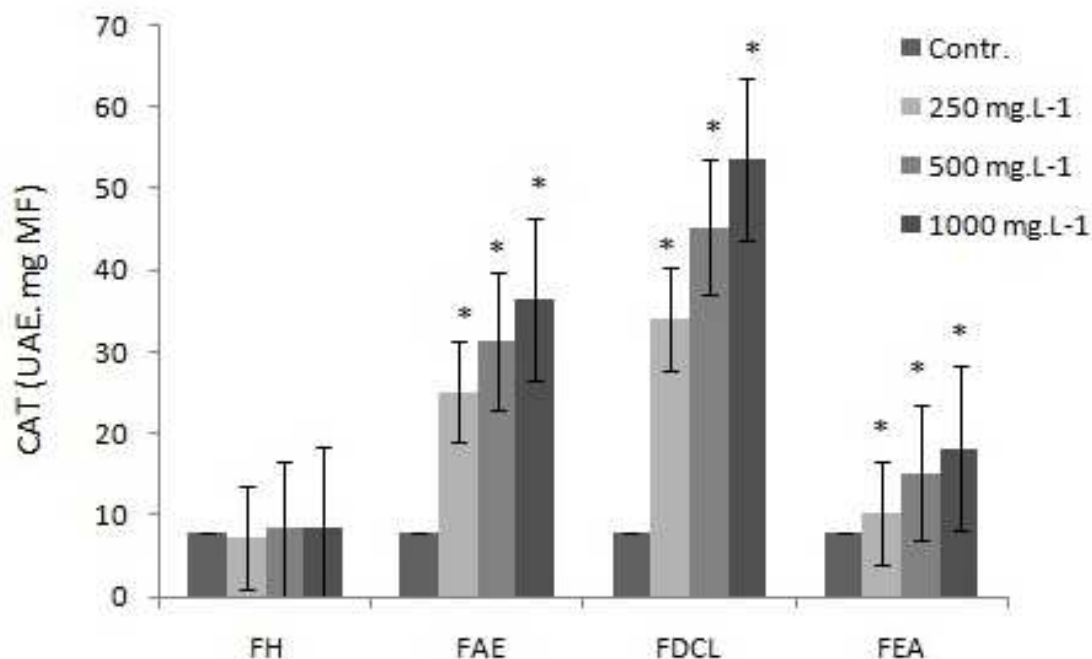


GRÁFICO 10 – ATIVIDADE DA CATALASE EM FUNÇÃO DAS CONCENTRAÇÕES DAS FRAÇÕES HEXÂNICA (FH), FRAÇÃO ACETATO DE ETILA (FAE), FRAÇÃO DICLOROMETANO (FDCL) E FRAÇÃO ETANOL-ÁGUA (FEA) DE *A. SPATHULATA* EM *Lactuca sativa*. DADOS EXPRESSOS EM PERCENTUAL EM RELAÇÃO AO CONTROLE. *A média do tratamento difere significativamente ($p < 0,05$) em comparação com a média do controle, pelo teste de Tukey.

Várias enzimas antioxidantes têm suas atividades aumentadas nas folhas de plantas em resposta à infecção, minimizando os efeitos do estresse oxidativo. A catalase é a enzima envolvida diretamente na remoção do peróxido de hidrogênio (RIEDLE-BAUER, 2000). As peroxidases estão relacionadas com os processos de crescimento e diferenciação celular e com mudanças morfogênicas em resposta aos estresses físico, químico e biológico. O aumento da atividade desta enzima em plantas submetidas a estas condições pode ser fator determinante da capacidade de adaptação da planta, podendo tal atividade ser identificada como um marcador bioquímico de estresse.

A importância da atividade da polifenoloxidase está relacionada à resistência em plantas e deve-se, provavelmente, à sua propriedade em oxidar compostos fenólicos para quinonas, os quais são muito mais tóxicos aos microrganismos do que o fenol original. Por esta razão, admite-se que um aumento na atividade da polifenoloxidase resulta em altas concentrações de produtos tóxicos de oxidação e, portanto, maior grau de resistência (AGRIOS,

1997; ZHENG-CUIMING *et al.*, 1999). Nos resultados obtidos observou-se um aumento na atividade da polifenoxidase nas maiores concentrações das frações FAE e FDCL (Gráfico 11).

Com relação ao gasto energético, foi observado uma baixa produção de α -amilase em todas as frações e concentrações ensaiadas, em comparação ao controle, sendo que a fração hexânica e diclorometano causaram menor produção quando comparadas às demais (Gráfico 12). Pode-se inferir que existe uma relação entre redução na velocidade de germinação e porcentagem final de germinação, uma vez que a α -amilase é produzida pela camada de aleurona em resposta à ação das giberelinas, sendo liberada dentro do endosperma onde causa a conversão de amido em açúcares, utilizados no crescimento do embrião (ARTECA, 1995). Nolan e Ho (1988) verificaram redução na atividade de α -amilase em sementes de aveia tratadas com ABA. Segundo esses autores, este hormônio poderia estar agindo no sentido de evitar que a giberelina suprimisse a síntese de proteína, que causaria a desestabilização do mRNA, responsável pela síntese de α -amilase.

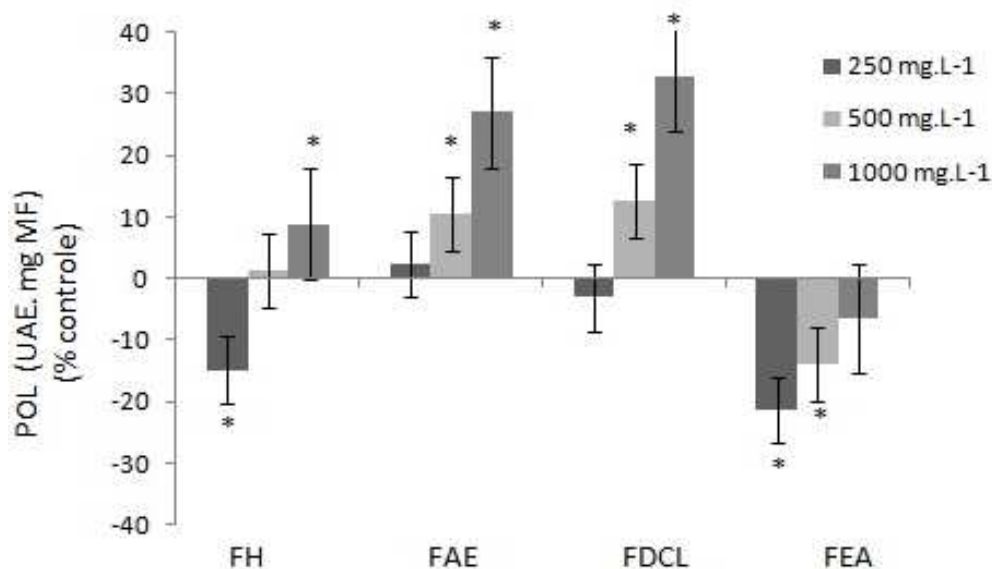


GRÁFICO 11 – ATIVIDADE DA POLIFENOLOXIDASE EM FUNÇÃO DAS CONCENTRAÇÕES DAS FRAÇÕES FH, FAE, FDCL E FEA DE *A. spathulata* EM *Lactuca sativa*. DADOS EXPRESSOS EM PERCENTUAL EM RELAÇÃO AO CONTROLE. *A média do tratamento difere significativamente ($p < 0,05$) em comparação com a média do controle, pelo teste de Tukey.

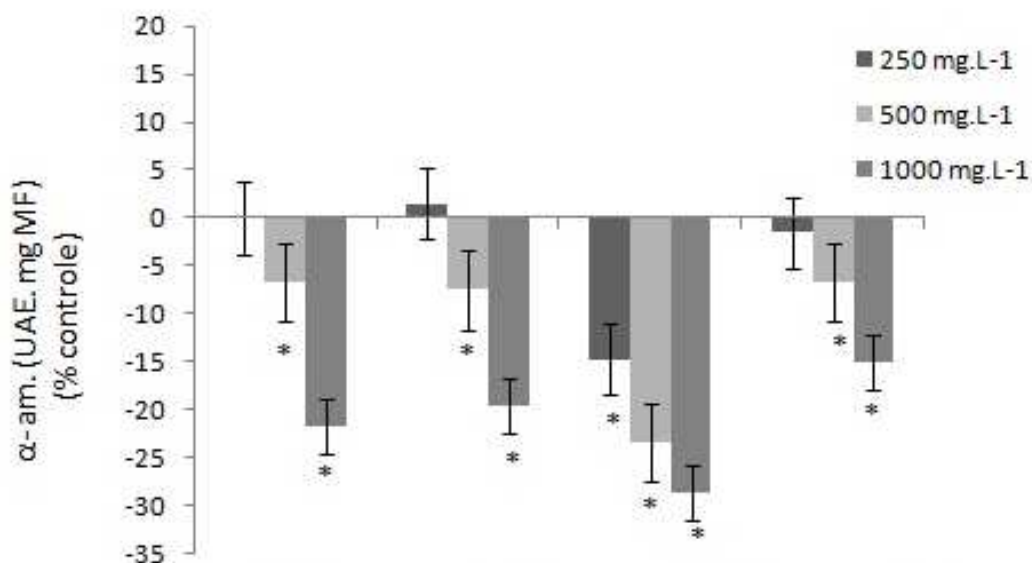


GRÁFICO 12 – ATIVIDADE DA α -AMILASE EM FUNÇÃO DAS CONCENTRAÇÕES DAS FRAÇÕES FH, FAE, FDCL E FEA DE *A. spathulata* EM *Lactuca sativa*. DADOS EXPRESSOS EM PERCENTUAL EM RELAÇÃO AO CONTROLE. *A média do tratamento difere significativamente ($p < 0,05$) em comparação com a média do controle, pelo teste de Tukey.

Com relação à atividade respiratória e ao teor de clorofila, foi observado que todas as frações e concentrações ensaiadas causaram redução na atividade respiratória e teor de clorofila em alface. A FAE e FDCL causaram reduções na respiração em raízes superiores a 50% em todas as concentrações (Gráfico 13). No teor de clorofila foi verificado que todas as frações causaram redução significativa na produção deste pigmento. Entretanto, apenas a fração diclorometano foi capaz de causar inibição de até 50% nas maiores concentrações ensaiadas (Gráfico 14).

Vários autores têm reportado que algumas classes de aleloquímicos inibem a fotossíntese por induzir mudanças no conteúdo de clorofila das plantas receptoras (EINHELLIG; KUAN 1971; EINHELLIG; RASMUSSEN, 1979; BLUM; REBBECK, 1989; BAZIRAMAKENGA *et al.*, 1994; CHOU, 1999). A aparência clorótica das plantas seria um sintoma da degradação das moléculas de clorofila ou da inibição da sua síntese, ambos os efeitos mediados por aleloquímicos, que impedem a formação das Mg-porfirinas (EINHELLIG, 1986). Em ambos os casos, esses efeitos lembram a atuação dos herbicidas, como as piridazinonas e imidazolinonas (DUKE, 1985; CAYON *et al.*, 1990).

As alterações no padrão de germinação e crescimento podem ser resultadas de diversos efeitos causados em nível primário (GUSMAN *et al.*, 2008). Dentre elas, Ferreira e Áquila (2000) destacam alterações na permeabilidade de membranas, na transcrição e tradução do DNA, no funcionamento de mensageiros secundários, na respiração, pelo seqüestro do oxigênio, na conformação de enzimas e receptores, ou ainda, pela combinação destes fatores.

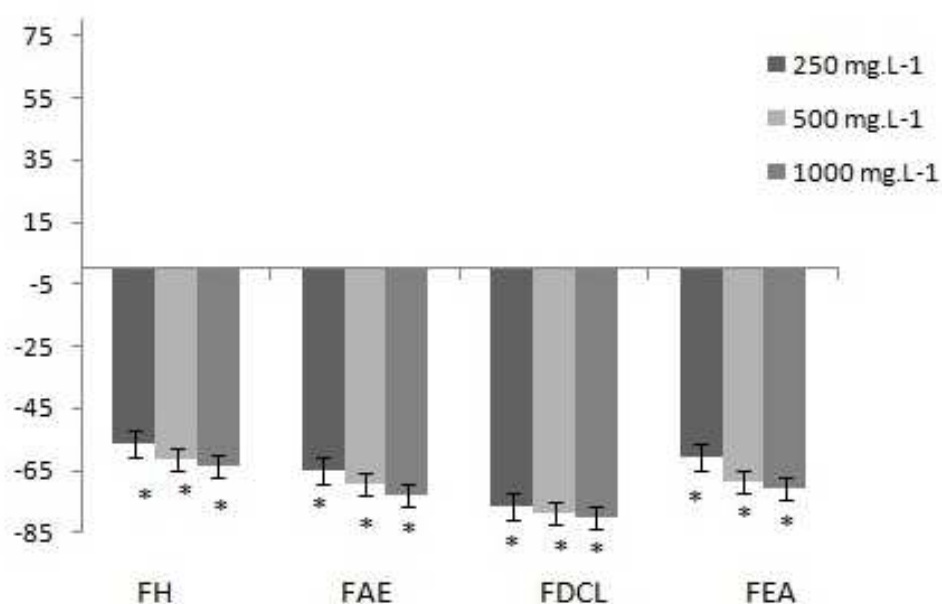


GRÁFICO 13 – ATIVIDADE RESPIRATÓRIA EM RAÍZES EM FUNÇÃO DAS CONCENTRAÇÕES DAS FRAÇÕES HEXÂNICA (FH), FRAÇÃO ACETATO DE ETILA (FAE), FRAÇÃO DICLOROMETANO (FDCL) E FRAÇÃO ETANOL-ÁGUA (FEA) DE *A. spathulata* EM *Lactuca sativa*. Dados expressos em percentual em relação ao controle. *A média do tratamento difere significativamente ($p < 0,05$) em comparação com a média do controle, pelo teste de Tukey.

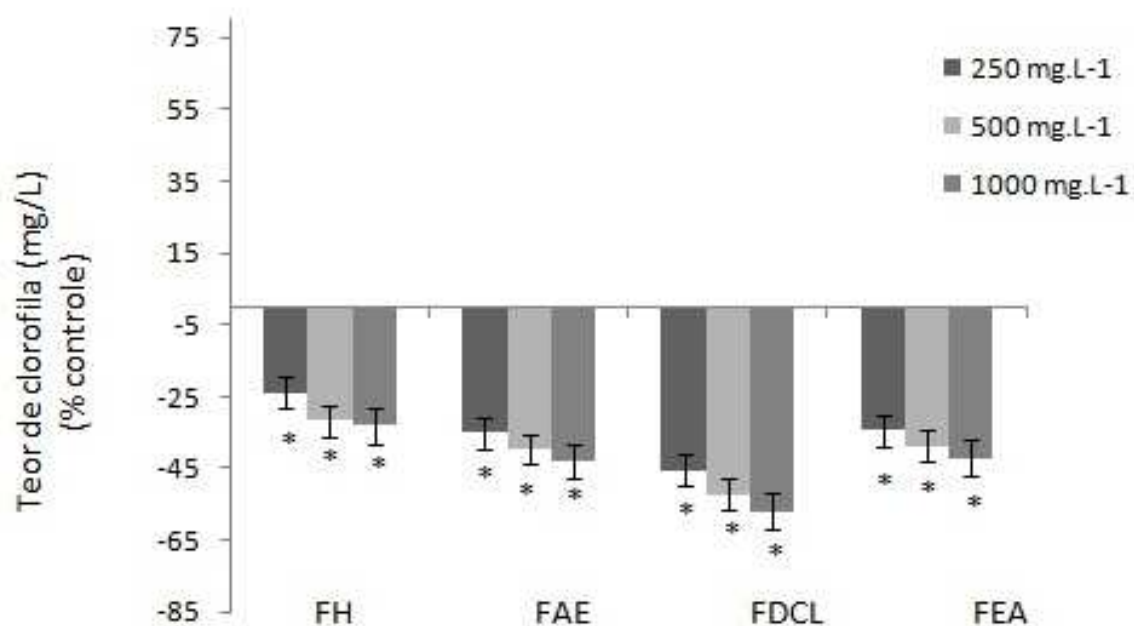


GRÁFICO 14 – TEOR DE CLOROFILA EM FUNÇÃO DAS CONCENTRAÇÕES DAS FRAÇÕES HEXÂNICA (FH), FRAÇÃO ACETATO DE ETILA (FAE), FRAÇÃO DICLOROMETANO (FDCL) E FRAÇÃO ETANOL-ÁGUA (FEA) DE *A. spathulata* EM *Lactuca sativa*. Dados expressos em percentual em relação ao controle. *A média do tratamento difere significativamente ($p < 0,05$) em comparação com a média do controle, pelo teste de Tukey.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O material botânico foi coletado no litoral do Paraná e litoral norte de Santa Catarina, a espécie foi identificada como sendo *Acicarpa spathulata*. A partir do extrato etanólico da droga seca foi identificado a presença de um cafeoilquínico identificado por CLAE com adição do padrão como ácido clorogênico. Foi demonstrada a presença de 4 iridóides ou seco-iridóides, sendo que dois seco-iridóides foram identificados em uma mistura como sendo secologanina e secologanol, que foi isolada aliando técnicas de cromatografia em colunas com CLAE semipreparativa. As suas estruturas químicas foram elucidadas e confirmadas pelas técnicas de espectrometria no ultra-violeta, no infra-vermelho próximo e por espectroscopia de ressonância magnética nuclear hidrogênio e de carbono. Não há registro da identificação prévia destes compostos na espécie.

A análise de atividade antimicrobiana demonstrou que a *A. spathulata*, possui atividades antimicrobianas. As frações FAE e DC, as quais apresentaram as maiores concentrações dos seco-iridóides identificados, apresentaram inibição no crescimento de *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus epidermidis* na diluição de 1:16, o que pode indicar uma atividade antimicrobiana dos seco-iridóides frente esses microorganismo. A fração FH demonstrou forte inibição ao crescimento de *Pseudomonas aeruginosa* mesmo em diluições de 1:64.

A investigação do potencial alelopático da parte aérea de *A. spathulata* em laboratório evidencia que essa espécie apresenta compostos químicos com atividade fitotóxica na germinação, crescimento e nos mecanismos de defesa da alface.

A fração acetato de etila e a fração diclorometano apresentaram a maior fitotoxicidade em todos os parâmetros avaliados, sendo por sua vez ricas em seco-iridóides que podem estar causando os efeitos citados. Os resultados obtidos nas análises com enzimas e de índice mitótico demonstram os possíveis mecanismo da ação fitotóxica.

A mistura de seco-iridóides IR1 e IR2 demonstrou capacidade na ativação de neutrófilos em todas as concentrações testadas, possuindo

potencial para futuros testes de atividade destes para utilização em processos inflamatórios e infecciosos.

Os resultados obtidos neste trabalho indicam a potencialidade da *A. spathulata* em produzir compostos com diversas atividades biológicas. Aqui ficou demonstrada a possibilidade de utilização do extrato, frações ou dos seco-iridóides da *A. spathulata* como herbicida, porém são necessários estudos posteriores para melhor avaliação. Da mesma forma, outros compostos que possuem características semelhantes aos seco-iridóides foram detectados, mas não foram isolados e identificados, sendo estes possíveis objetivos de trabalho posterior. A atividade de ativação de neutrófilos mostrou a capacidade destes compostos em agirem no sistema imunológico, abrindo mais uma frente para pesquisas futuras.

REFERÊNCIAS

ABREU, J.S. *et al.* Leukocytes respiratory burst and lysozyme level in pacu (*Piaractus mesopotamicus* Holmberg, 1887). **Brazilian Journal of Biology**, v.69, n.4, p. 1133-1139, 2009.

AEBI, H. 1984. Catalase in vitro. **Meth. Enzymol.** 105: 121-126.

AGILENT TECHNOLOGY. **Semi-preparative purification of synthesis products with the Agilent high-throughput analysis system**, n. 5980-1660E, 2000, disponível em <<http://www.chem.agilent.com/Library/applications/59801660.pdf>>. Acesso em: 23/12/2010.

AGRIOS, g.n. **Plant pathology**. San Diego: Academic Press, 1997. 635p.

ALMEIDA, F. S. **Alelopatia e as plantas**. Londrina: IAPAR, 1988.

ALMEIDA, R. N.; NAVARRO D. S.; BARBOSA-FILHO, J.M. Plants with central analgesic activity. **Phytomedicine**, v. 4, n. 8, p. 310-322, 2001.

ALVES, C. C. F.; ALVES, J. M.; SILVA, T. M. S.; CARVALHO, M. G.; NETO, J. J. Atividade alelopática de alcalóides glicosilados de *Solanum crinitum* Lam. **Floresta e ambiente**, v. 10, n. 1, p. 93-97, 2003.

ALVES, C.Q. *et al.* Métodos para determinação de atividade antioxidante in vitro em substratos orgânicos. **Química Nova**, v.33, n.10, p. 2201-2210, 2010.

AQUINO, R.; CAPASSO, A.; GAROFALO, L.; URRUNAGA, R.; SORRENTINO, L. **Investigaciones sobre la hierba medicinal *Acicarpha tribuloides* Juss. (Estrella quisca)**. Rev. Situa 1999; ano 5, n. 9 17. Disponível em: <http://sisbib.unmsm.edu.pe/Bvrevistas/situa/1997_n9/investigaciones_hierba_.htm>. Acesso em: 12/07/2009.

AOAC - ASSOCIATION OF OFFICIAL AGRICULTURAL CHEMISTS, **Official methods of analysis**. 10. ed. Washington: Editorial Board, 1965. 909p.

ARNON, D. I. Copper and enzymes in isolated chloroplast. Polyphenoloxidases in *Beta vulgaris*. **Plant Physiology**, v.24, n. 2, p.1-15, 1949.

BAGGIO, A. A.; MEDRADO, M. J. S. **Sistemas Agroflorestais e Biodiversidade**. Embrapa floresta, Curitiba, PR. Disponível em: <<http://saf.cnpqg.embrapa.br/publicacoes/05.pdf>>. Acesso em: 04/06/2009.

BALUNAS, M. J.; KINGHORN, A. D. Drug Discovery from Medicinal Plants, **Life Sciences**, v. 78, p. 431-441, 2005.

BIER, O. **Microbiologia e Imunologia**. 30 ed. São Paulo: Ed. Melhoramentos, 1994.

BOEGER, M. R. T.; GLUZEZAK R. M. Adaptações estruturais de sete espécies de plantas para as condições ambientais da área de dunas de Santa Catarina, Brasil. **IHERINGIA**, Sér. Bot., Porto Alegre, v. 61, n. 1-2, p. 73-82, jan./dez., 2006.

BOWLES, D.J. Defense related proteins in higher plants. **Biochemistry**, v. 59, p. 837- 907, 1990.

BOHM, B.A.; STUESSY, T.F. **Flavonoids of the sunflower family (Asteraceae)** Springer-Verlag Wien, New York, p. 586, 2001.

BRASIL. **Ministério da Agricultura e Reforma Agrária. Regras para a Análise de Sementes**, Brasília: SNDA/DNDU/CLU, 1992.

BREMER, K.; ANDERBERG, A. A.; KARIS, P.; NORDENSTAM, B.; LUNDBERG, J. and RYDING, Olof. **Asteraceae, Cladistics & Classification**. Portland, Oregon: Timber Press, 1994.

BREUSEGEM, F. V.; VRANOVA, E.; DAT, J.F.; INZE, D. The role of active oxygen species in plant signal transduction. **Plant Science**, v. 161, p. 405-414, 2001.

CARBONEZIA, C. A.; MARTINS, D.; YOUNG, M. C. M.; LOPES, M. N.; FURLAN, M.; RODRIGUES FILHO, E. and BOLZANIA, V. S. Iridoid and seco-iridoid glucosides from Chiococca Alba (Rubiaceae)¹, **Phytochemistry**, n. 51, p. 781-785, 1999.

CARDOSO, A. A.; MELCHERT, W. R. Construção de Amostrador Passivo de Baixo Custo para Determinação de Dióxido de Nitrogênio. **Química Nova**, v. 29, n. 2, p. 365-367, 2006.

CARVALHO, J.E. Fitoterápicos: Alimento ou Medicamento? In: MERCADANTE, A.Z.; BOBBIO, F.O.; BOBBIO, P.A; PEREIRA, J.L.; PASTORE, G.M. **Ciência de Alimentos: avanços e perspectivas**, vol II. Faculdade de Engenharia de Alimentos da Unicamp, Campinas, p.196-202, 2001.

CAYON, D.G.; LOPES, N.L.; OLIVA, M.A., SILVA, J.F. Teores de clorofila e proteína bruta em soja (*Glycine max* (L.) Merrill) tratada com imazaquin. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v. 2, p. 33-40, 1990.

CHOU, C.H. Roles of allelopathy in plant biodiversity and sustainable agriculture. **Critical Reviews in Plant Science** 18: 609-636, 1999.

CONAMA – **Conselho Nacional do Meio Ambiente**. RESOLUÇÃO CONAMA nº 7, de 23 de julho de 1996. Publicada no DOU n. 165, de 26 de agosto de 1996, Seção 1, páginas 16386-16390, 1996.

CONTIN, A.; VAN DER HEIJDE, R; LEFEBER, A.W.M.; VERPOORTE, R. The iridoid glucoside secologanin is derived from the novel triose phosphate / pyruvate pathway in a *Catharanthus roseus* cell culture. **FEBS**. n. 434, p.413-416, 1998.

CHUNG, I.M.; A.H.N, J.K.; YUN, S.J. Assessment of allelopathic potential of barnyard grass (*Echinochloa crus-galli*) on rice (*Oriza sativa* L.) cultivars. **Crop Protection**, v. 20, p.921-928, 2001.

CRUZ-ORTEGA, R.; ANAYA, A. L.; HERNÁNDEZ-BAUTISTA, B. E. and LAGUNA-HERNÁNDEZ, G. Effects of allelochemical stress produced by *Sicyios deppei* on seedling root ultra structure of *Phaseolus vulgaris* e *Curcubita ficifolia*. **Journal of Chemical Ecology**, n. 24, (12) p. 2039-2057, 1998.

DAL FORNO, M. 2009, **A Família Graphidaceae (Ascomycota Liqueenizados) em Restinga em Pontal do Sul, Pontal do Paraná, Paraná**. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) – Departamento de Biologia, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2009.

DALL´STELLA, D. S. G. **Estudo Fitoquímico Aplicado da Fração Solúvel do Extrato Etanólico Bruto da *Dorstenia Multiformis* Miquel (Moraceae)**. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Departamento de Farmácia, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2009.

DÉCOSTERD, L. A.; DORSAZ, A.; HOSTETTMANN, K. Application of semi-preparative high-performance liquid chromatography to difficult natural product separations. **Journal of Chromatography**, Elsevier Science Publishers B.V., Amsterdam, n. 406, p. 367-373, 1987.

DE WIT, P.J.G.M. How plants recognize pathogens and defend themselves. **Cellular and Molecular Life Science**, v. 64, n. 21, p. 2726-2732, 2007.

DIAS, J. F. G. **Estudo alelopático aplicado a *Aster lanceolatus* Willd.** Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Departamento de Farmácia, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2005.

DIETZ, H.; WINTERHALTER, P. Phytotoxic constituents from *Bunias orientalis* leaves. **Phytochemistry**, v. 42, n. 4, p. 1005-1010, 1996.

DINDA, B.; CHOWDHURY, D.R.; MOHANTA, B.C. Naturally occurring iridoids, seco-iridoids and their bioactivity. An Updated Review, Part 3. **Chemical Pharmaceutical Bulletin**, v. 8, n. 57, p. 765-796, 2009.

DINDA, B.; DEBNATH, S.; HARIGAYA, Y. Naturally Occurring Iridoids. A Review, Part 1. **Chemical Pharmaceutical Bulletin**, v. 2, n. 55, p. 159-22, 2007.

DINDA, B.; DEBNATH, S.; HARIGAYA, Y. Naturally Occurring Secoiridoids and Bioactivity of Naturally Occurring Iridoids and Secoiridoids. A Review, Part 2. **Chemical Pharmaceutical Bulletin**, v. 5, n. 55, p. 689-728, 2007.

DROGE, W. Free radicals in the physiological control of cell function. **Physiological Reviews**, v. 82, p. 47-85, 2002.

DUANGMAL, K. & APENTEN, R.K.O. A comparative study of polyphenoloxidases from taro (*Colocasia esculenta*) and potato (*Solanum tuberosum* var. Romano). **Food Chemistry** v.64, 351-359. 1999.

DUKE, S.O., RIMANDO, A.M., BAERSON, S.R., SCHEFFLER, B.E., OTA, E. Strategies for the use of Natural Products for Weed Management. **Journal of Pesticide Science**. v. 27, p. 298-306, 2002.

_____; SCHEFFLER, B.E., DAYAN, F.E. Allelochemicals as herbicides. **First European Allelopathy Symposium**. Vigo, Spain. p. 47-59, 2001.

_____; BAERSON, S.R.; DAYAN, F.E.; , KAGAN, I.A. Chemical from nature for weed management. **Weed Science**, v. 50, n. 2, p. 138-151, 2002.

DURIGAN, J. C.; ALMEIDA, F. S. **Noções sobre a alelopatia**. Jaboticabal: UNESP / FUNEP, 1993. 28 p. Boletim.

EINHELLIG, F. A. Interactions involving allelopathy in cropping systems. **Agronomy Journal**, Madison, v. 88, n. 6, p. 886-893, 1996.

_____. The physiology of allelochemical action: Clues and views. In: REIGOSA, M. and PEDROL, N. **Allelopathy from Molecules to Ecosystems**, Vigo, Universidade de Vigo, p. 1-23, 2002.

EL NAGGAR, L.J.; BEA, J.L. Iridoids a Review. **Journal of Natural Products**, v. 43, n. 6, p. 652, 1980.

FARMACOPEIA BRASILEIRA. 4 ed. Rio de Janeiro: Ateneu, 1988.

FERNANDES, P.D.; MATHEUS, M.E.; MANTOVANI, I.S.B.; SANTOS, G.B.; FERNANDES, S.B.O.; MENEZES, F.S.; Ação de extratos do açaí (*Euterpe oleracea* Mart.) sobre a produção de óxido nítrico em células RAW 264.7. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 13, supl., p. 03-05, 2003.

FERRARESE, M.L.L.; SOUZA, N.E.; RODRIGUES, J.D. & FERRARESE FILHO. Ferulic acid uptake by soybean root in nutrient culture. **Acta Physiologiae Plantarum** 22: 121-124, 2000.

FERREIRA, A.G.; AQUILA, M.E.A. Alelopatia: uma área emergente da ecofisiologia. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v. 12, p. 175-204, 2000.

FINNEY, D.J. **Probit Analysis**. Cambridge: Cambridge University Press, 1956.

GATTI, A. B.; PEREZ, S. C.; LIMA, J.G.A.S. Allelopathic activity of aqueous extracts of *Aristolochia esperanzae* O. Kuntze in the germination and growth of *Lactuca sativa* L. and *Raphanus sativus* L. **Acta Botânica Brasilica**, v.18, n.3, p. 459-472, jul./set. 2004.

GAZDA, V.E. **Abordagem Química e Estudo da Atividade Biológica das Raízes de *Chiococca alba* (L.) HITCHC. (RUBIACEAE)**. Dissertação (Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Farmácia. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2009.

GUERRA, M. P.; NODARI, R. O. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. Organizado por Simões *et al.*, 5ª ed. cap. 1, 2007, 15 p.

GOMES, E. P. C., **Dinâmica do componente arbóreo de um trecho de mata em São Paulo, SP**. Tese (Doutorado), Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1998.

GOTTLIEB, O. R.; BORIN, M. R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. Organizado por Simões *et al.*, 5 ed., cap 4, 2007, 92 p.

GRAY, T. M., ARNOYS, E. J., BLANKESPOOR, S., et al., Destabilizing effect of proline substitutions in two helical regions of T4 lysozyme: Leucine 66 to proline and leucine 91 to proline. **Protein Science**, v.5, 742-751, 1996.

GUSMAN, G. S., BITTENCOURT, A. H. C., VESTENA, S. Alelopatia de *Baccharis dracunculifolia* DC. sobre a germinação e desenvolvimento de espécies cultivadas. **Acta Scientiarum. Biological Sciences**, v.30, 119-125, 2008..

HALPIN, B.E.; LEE, C.Y. Effect of blanching on enzyme acitivity and quality changes in green peas. **Journal of Food Sciences**., Chicago, v. 52, p. 1002-1005, 1987.

HELLWIG, F.H. **The Families and Genera of Vascular Plants & Flowering Plants: Eudicots – Asterales**. Edited By Joachim W. Kadereit and Charles Jeffrey, 2007, 72 p.

HIGASHI, T. *et al.* Redução do nitroblue tetrazolium (NBT) e resultados falso-positivos: esquistossomose mansônica e doença de Chagas. **Revista do Instituto de Medicina Tropical**, v. 18, p. 276-282, 1976.

INDERJIT, D. Plant phenolics in allelopathy. **The Botanical Review**, v. 2, n. 62, p. 186-202, 1996.

_____.; DUKE, S.O. Ecophysiological aspects of allelopathy. **Planta**, v. 217, p. 529-539, 2003.

INZE, D.; MONTAGU, M.V. Oxidative stress in plants. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 6, p. 153-158, 1995.

JENSEN, S. R.; CHARLOTTE, H.; GOTFREDSEN, U.; HARPUT, S.; SARACOGU, I. Chlorinated Iridoid Glucosides from *Veronica longifolia* and Their Antioxidant Activity. **Journal of Nature Products**, n. 73, p. 1593-1596, 2010.

JESUS, M. C. F. **Etnobotânica na Ilha de Guriri, São Mateus / Conceição da Barra**. Monografia. Bacharelado em Ciências Biológicas, Departamento de Biologia, Universidade Federal do Espírito Santo, Espírito Santo, 1997.

KONEMMAN E. W.; ALLEN, S. D.; DOWWEL JR, V. R.; SOMMERS, H. M..**Diagnóstico microbiológico – texto e atlas colorido**. 2 ed. São Paulo: Medicina Panamericana, Editora do Brasil Ltda., p. 458-479, 1993.

KRZYZANOWSKI, F.C.; VIEIRA, R. D.; FRANÇA NETO, J.B. **Vigor de sementes: conceitos e testes**. Londrina: Abrates, 1999. p. 210.

LEVINSKY, R. J. *et al.* Phorbol myristate acetate stimulated NBT test: a simple method suitable for antenatal diagnosis of chronic granulomatous disease. **Clinical & Experimental Immunology**, v.54, p.595-598, 1983.

LU, Y., SUN, C., PAN, Y. A comparative study of upright counter-current chromatography and high-performance liquid chromatography for preparative isolation and purification of phenolic compounds from *Magnoliae officinalis*. **Journal of Separation Science**, v. 29, p. 351-357, 2006.

MACBRIDE, J. F. Flora of Peru. **Fieldiana Botany series** v. 13, part 2, n. 2, University of Illinois Chicago, U.S.A 1937 Disponível em <www.archive.org/stream/floraofperu22fimacb/floraofperu22fimacb_djvu.txt> Acesso em: 18/12/2009.

MACIAS, F. A.; CASTELLANO, D.; MOLINILLO J. M. G. Search for a standard phytotoxic biassay for allelochemicals. Selection of standard target species. **Journal of Agricultural Food and Chemistry**, v. 48, n. 66, p. 2512-2521, 2000a.

_____; FERNANDEZ, A.; VARELA, R.M.; MOLINILLO, J.M.G.; TORRES, A.; ALVES, P.L.C.A. Sesquiterpene lactones as allelochemicals. **Journal of Natural Products**, v. 69, n. 5, p. 795-800, 2006.

_____; GALLINDO, J.C.G.; MOLINILLO, J.M.G. Plant biocommunicators: Application of allelopathic studies. In: **2000 Years of Natural Products Research Past, Present and Future**, Ed Teus J.C. Luijendijk, Phytoconsult, p. 137-161, 2000b.

MAGUIRE, J.D. Speed of germination – aid in selection and evaluation for seedling emergence and vigor. **Crop Science**, v. 1, p.176-177, 1962.

MALHEIROS, A.; PERES, M. T. L. P. Alelopatia: interações químicas entre espécies. In: YUNES, R. A.; CALIXTO, J. B. **Plantas medicinais sob a ótica da química medicinal moderna**. Chapecó: Argos, 2001. p. 503-523.

MALLICK, N.; RAI, L.C. Response of the antioxidant systems of the nitrogen fixing cyanobacterium *Anabaena doliolum* to the copper. **Journal of Plant Physiology**, v. 155, p. 146-149, 1999.

MAPA DISTRIBUIÇÃO, disponível em:
<www.freewebs.com/rapinibot/embriofitas/parte9.pdf>. Acessado em: 07/05/2009.

MARGIS-PINHEIRO, M.; SANDRONI, M.; LUMMERZEIM, M.; OLIVEIRA, D. A defesa das plantas contra as doenças. **Ciência Hoje**, v. 25, p. 24-31, 1999.

MARQUES, M. R., XAVIER-FILHO, J., Enzymatic and inhibitory activities of cashew tree gum exudate. **Phytochemistry**, v.30(5),1431-1433, 1991.

MEDEIROS, A.R.M. Alelopatia – importância e suas aplicações. **Horti Sul**. v.1, n. 3, p. 27-32, 1990.

MERAGELMAN, T.L.; RENTERIA, B. S.; SILVA, G.L.; SOTOMAYOR, C.; GIL, R.R. Modified seco-iridoid from *Acicarpha tribuloides* and inhibition of nitric oxide production in LPS-activated macrophages. **Phytochemistry**, v. 67, p.1534-1538, 2006.

MEYER, B.N. *et al.* Brine Shrimp: a convenient general bioassay for active plant constituents. **Planta medica**, v. 45, p. 31, 1982.

MITTLER, R. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. **Trends in Plant in Science**, v. 9, p. 405-410, 2002.

MORELLATO, P. C.; HADDAD, C. F. B. Introduction: the Brazilian Atlantic Forest. **Biotropica**. v. 32 (4b), p.786-792, 2000.

MPONDO MPONDO, E.; GARCIA, J. New Seco-iridoid Glucosides from *Gentzana verna*. **Phytochemistry**, v. 29, n. 2, p. 643-644, 1990.

MYERS, N. Threatened biotas: “hotspots” in tropical forests. **Environmentalist**, v. 8, p. 187-208, 1998.

_____; MITTERMEIER, R. A.; MITTERMEIER, C. G.; FONSECA, G. A. B.; KENT, J. Biodiversity hotspots for conservation priorities. **Nature**, n. 403, p. 853-858, 2000.

NEWMAN, D.J.; CRAGG, G.M.; SNADER, K.M. Natural products as sources of new drugs over the period 1981-2002. **Journal of Natural Products**, v. 66, p. 1022-1037, 2003.

NOLAN, R.C. & HO, T.D. Hormonal regulation of α -amylase expression in barley aleurone layers. **Plant Physiology**, 88: 588 -93, 1988.

NORDBERG, J.; ARNÉR, E.S.J. Reactive oxygen species, antioxidants and the mammalian thioredoxin system. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 31, n.11, p. 1287-1312, 2001.

OLIVEIRA, V.R.; SCAPIM, C.A.; OLIVEIRA JR., R.S.; & PIRES, N.M. Efeito do herbicida trifluralin sobre a germinação de sementes e índice mitótico em raízes de milho (*Zea mays* L.). **Revista Unimar**, 18: 537-544, 1996.

PARK, B.H. Infection and nitroblue-tetrazolium reduction by neutrophils. **The Lancet**, p. 532-534, 1968.

_____; GOOD, R.A. N.B.T. test stimulated. **The Lancet**, p. 616, 1970.

PELLISSIER, F. Allelopathic inhibition of spruce germination. **Acta Oecologica**, v. 2, n. 14, p. 211-218, 1993.

PUTTER, J., 1974. Peroxidase. In: Methods of Enzymatic Analysis, Bergmeyer, H.U. (Ed.), **Verlag Chemie**, Weinhan, pp: 685-690.

PUTNAM, A.R.; TANG, C.S. Allelopathy state of the science. In: PUTNAM, A.R.; TANG, C.S. **The science of allelopathy**. John Wiley & Sons: New York, p. 1-19, 1986.

RANTA, P.; BROM, T.; JOENSUU, E.; MIKKO, S. The fragmented Atlantic forest of Brazil: size, shape and distribution of forest fragments. **Biodiversity and conservation**, v. 7, p. 385-403, 1998.

RAPINI, A. **Sistemática vegetal: Embriófitas**, p.193-194, 2009.
<www.freewebs.com/rapinibot/embriofitas/parte9.pdf>. Acesso em: 05/07/2009.

RICE, L. **Allelopathy**, Academic Press: 423 p., Londres, 1984.

RIEDLE-BAUER, M. Role of reactive oxygen species and antioxidant enzymes in systemic virus infections of plants. **J. Phytopathol**, n. 148, p. 297-302, 2000.

ROCHA, J. M. S.; MOURA, J. P. **Estudo Etnobotânico para Preservação da Área de Restinga da Praia de Guriri em São Mateus / ES: Aspectos de Licenciamento Ambiental**. UNIVEN/ES; UNISAM/ES. Disponível em <<http://www.revistaeea.org/artigo.php?idartigo=721&class=21>>. Acesso em: 22/10/2010.

RODRIGUES, L. R. A.; RODRIGUES, T. J. D.; REIS, R. A. **Alelopatia em plantas forrageiras**. Jaboticabal: UNESP / FUNEP, 1992, 18 p. Boletim.

ROMEIRO, R. S. **Métodos em bacteriologia de plantas**, Viçosa: Ed. UFV, 2001.

RUSSEL, R.S. PLANT ROOT SYSTEMS: Their function and interaction with the soil. **European plant biology**. MC Graw-Hill Boock Company (UK) Limited, London, 1 ed, 290 p, 1977.

SAMPAIO-SANTOS, M.I.; KAPLAN, M.A.C. Superordem Corniflorae: Química, Etnofarmacologia e Farmacologia. **Química Nova**, v. 20 n. 6 p. 599-611, 1997.

_____; MOTA, G.J.M.; BARBOSA, D.A.; KAPLAN, M.A.C. Main Constituents from *Acicarpa spathulata* (CALYCERACEAE). **Bollettino Chimico Farmaceutico**, v. 138, n. 2, p. 107, 1999.

SANTOS, R.I. Metabolismo básico e origem dos metabólitos secundários. In: SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. **Farmacognosia: da Planta ao Medicamento**. 4 ed. Porto Alegre / Florianópolis: Ed Universidade - UFRGS / Ed. da UFSC, p. 333-364, 2002.

SANTOS, S.; REZENDE, M.O.O. Avaliação do potencial herbicida de compostos secundários na germinação de sementes de plantas daninhas encontradas em pastagens. **Revista Analytica**, v. 2, n. 32, p. 72-74, 2008.

SASAKI, C. M. **Estudo Fitoquímico e Avaliação das Atividades Alelopáticas e Antimicrobianas das Partes Aéreas de *Pterocaulon Lorentzii* Malme (Asteraceae)**. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Departamento de Farmácia, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2008.

SCANDALIOS, J.G. Oxygen stress and superoxide dismutase. **Plant Physiology**, v. 101, p. 7-12, 1993.

SCHMID, J.; AMRHEIN, N. Molecular organization of the shikimate pathway in higher plants. **Phytochemistry**, v. 39, n. 4, p. 737-749, 1995.

SHEWRY, P.R.; LUCAS, J.A. Plant proteins that confer resistance to pests and pathogens. **Advances In Botanical Research Incorporating Advances In Plant Pathology**, v. 26, p. 135-192, 1997.

SILVA, Z. L. Alelopatia e defesa em plantas. **Boletim Geográfico**, Rio de Janeiro, v. 36, n. 258-259, p. 90-96, 1978.

SMITH, A. F.; MARTIN, L. D. Allelopathic characteristics of three cool-season grass species in the forage ecosystem. **Agronomy Journal**, v. 86, n. 2, p. 243-246, 1994.

SOUZA, I. F. Alelopatia de plantas daninhas. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 13, n. 150, p. 75-78, 1988.

SOUZA-FILHO, A.P.S.; ALVES, S.M. Mecanismos de ação dos agentes alelopáticos. In: FILHO, A.P.S.S.; SÉRGIO, M.A. **Alelopatia: princípios básicos e aspectos gerais**. Embrapa. 2002. p.131-154.

STEPONKUS, P.L.; LANPHEAR, F.O. Refinement of the triphenyl tetrazolium chloride method of determining cold injury. **Journal of Plant Physiology**, v. 42, p.1423-26, 1967.

TEXEIRA, C.M., ARAUJO, J.B.S., CARVALHO, G.J. Potencial alelopático de plantas de cobertura no controle de Picão-Preto (*Bidens pilosa* L.). **Ciência Agrotécnica**, v. 28, n. 3, p. 691-695, 2004.

TUKEY JÚNIOR, H. B. Implications of allelopathy in agricultural plant science. **Botanical Review**, Bronx, v. 35, n. 1, p. 1-16, 1969.

TZAKOU, O. Iridoid glucosides with insecticidal activity from *Galium melanantherum*. **Zeitschrift für Naturforschung**, v. 62, p. 597, jul./2007.

UTYAMA, I.K.A. **Avaliação da atividade antimicrobiana e citotóxica *in vitro* do vinagre e ácido acético: perspectiva na terapêutica de feridas**. 148 f. Dissertação (Mestrado em Enfermagem) – Escola de Enfermagem de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2003.

VYVYAN, J.R. Allelochemicals as leads for new herbicides and agrochemicals. **Tetrahedron**. v. 58, p.1631-1646, 2002.

WATSON, L.; DALLWITZ, M.J. **The families of flowering plants: descriptions, illustrations, identification and information retrieval**. Version: 20th May 2010. <<http://delta-intkey.com/angio/www/calycera.htm>>. Acesso em: 18/12/2010.

WEIDENHAMER, J. D. Distinguishing resource competition and chemical interference: overcoming the methodological impasse. **Agronomy Journal**, Madison, v. 88, n. 6, p. 866-875, 1996.

WEIDENHAMER, J. D. et al. Just how insoluble are monoterpenes? **J. Chem. Ecol.**, v. 19, n. 8, p. 1799-1807, 1993.

YANG, X. P. YUAN, C. S., JIA, Z. J. Two New Antibacterial Iridoids from *Patrinia rupestris*. **Chinese Chemical Letters**, v. 17, n. 3, p. 337, 2006.

YE, H.; ZHONG, S.; LI, Y.; TANG, M.; PENG, A.; HU, J.; SHI, J.; HE, S.; WU, W.; CHEN, L. Enrichment and isolation of barbigerone from *Millettia pachycarpa*

Benth. using highspeed counter-current chromatography and preparative. **Journal of Separation Science**, n. 33, p. 1010-1017, 2010.

ZHENG-CUIMING; TENG-BING; GAO-FENGI; WU-ZONGPU; ZHENG-CM; TENG-B; GAO-FL; WU-ZP. Studies on the changes of superoxido dismutase, peroxidase and poliphenol oxidase in seed coat of soybeans after infection with soybean mosaic virus. **Scientia-Agricultura Sinica**, v.32, p.99-101, 1999.

ZULETA, L. M. C., CAVALHEIRO, A. J., SILVA, D. H. S., FURLAN, M., YOUNG, M. C. M., ALBUQUERQUE, S., CASTRO-GAMBOA, I., BOLZANI, V. S. Seco-Iridoids from *Calycophyllum spruceanum* Rubiaceae. **Phytochemistry**, n. 64, p. 549-553, 2003.